

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika õppetool

Rahel Valdmaa

**PEREKONNA *DIANTHUS* L.
SEKTSIOONI *PLUMARIA* LIIKIDE GENEETILINE
VARIEERUVUS JA FÜLOGENEETILISED SUHTED
MIKROSATELLIITMARKERITE ALUSEL**

Magistritöö, taime- ja seeneteaduse eriala

30 EAP

Juhendaja: Silvia Pihu PhD

Tartu 2016

Perekonna *Dianthus* L. sektsiooni *Plumaria* liikide geneetiline varieeruvus ja fülogeneetilised suhted mikrosatelliitmarkerite alusel

Perekond nelk on liigirikas rühm, mille paljud liigid on piiratud levilaga. On näidatud, et suur osa neist on lahknenu evolutsiooniliselt hiljuti ja lühikese aja jooksul, mistõttu oleks nelkide näitel võimalik uurida radiatsiooni, üht evolutsiooni olulist protsessi. Häid meetodeid nende fülogeneesi uurimiseks jaoks pole veel leitud, seega uurib töö, kas nelkide sektsiooni *Plumaria* sisest geneetilist variatsiooni ja fülogeneetilisi suhteid on võimalik uurida genoomides levinud lühikeste korduvjärjestuste e. mikrosatelliitide abil. 11 nelgi liigis tuvastati 146 alleeli 10-st tuuma lookusest ning leiti, et suur osa varieeruvusest on liikide sees. Peakoordinaatanalüüs ja dendrogrammid näitasid, et liigid ei eristunud üksteisest, v.a *D. superbis* ja *D. plumarius*. Seega, antud mikrosatelliitmarkerite abil on nende fülogeneesi raske uurida. Põhjuseid võib olla mitmeid – sektsiooni kunstlik püstitus, kehv geneetiline eristuvus ning perekonna jaoks välja töötatud markerite ebasobivus liikidevahelise fülogeneesi uuringuks.

Nelk; geneetiline varieeruvus; fülogeneetilised suhted; molekulaarsed markerid
B225 - taimegeneetika

Genetic variety and phylogenetic relationships within the genus *Dianthus* L. section *Plumaria* based on microsatellite analysis

Genus *Dianthus* L. is a diverse plant group, most species within it have an endemic area of distribution, suggesting that diversity originated only recently and rapidly. This has been shown by various studies, thus it is potentially possible to use this genus in order to investigate the evolutionary mechanism of rapid diversification or radiation. Suitable methods to study the internal phylogeny of this genus haven't been developed yet. The aim of this thesis is to investigate the efficiency of microsatellites (short tandem repeats in the genome) analysis method to evaluate the genetic variety and phylogenetic relationships within the section *Plumaria*. 146 alleles were identified from 11 species in 10 nuclear microsatellite loci. It was found that the majority of the variance was within species. The principal component analysis and dendrograms did not indicate clear clustering of species, except *D. superbis* and *D. plumarius*. Thus, it is difficult to analyse this genus with microsatellites. Possible reasons are the arbitrary definition of the section, poor genetic differentiation and the inadequate suitability of the molecular markers developed for the genus for studying its internal phylogeny.

Carnation; genetic variety; phylogenetic relationships; molecular markers
B225 – Plant genetics

Sisukord

1.	Sissejuhatus.....	4
2.	Kirjanduse ülevaade	6
2.1	Perekond nelk	6
2.2	Seksioon <i>Plumaria</i>	8
2.3	Mikrosatelliidid	14
3.	Materjal ja metoodika	19
3.1	Taimne materjal	19
3.2	DNA analüüs	21
3.3	Praimerite optimeerimine ja PCR.....	22
3.4	Fragmentanalüüs.....	25
3.5	Andmeanalüüs	25
4.	Tulemused.....	27
5.	Arutelu	35
6.	Kokkuvõte.....	39
7.	Summary	40
8.	Tänuavaldused	42
9.	Kasutatud kirjandus	43
10.	Lisad.....	49
10.1	Lisa 1: UPGMA isendipuu	49
10.2	Lisa 2: NJ isendipuu	51
10.3	Lisa 3: Heuristilise otsingu 100% konsensuspuu	53
10.4	Lisa 4: Heuristilise otsingu 50% konsensuspuu	55
	Lihtlitsents.....	57

1. Sissejuhatus

Perekond nelgi (*Dianthus*) hulka kuuluvad peamiselt mitmeaastased rohttaimed, millest paljud on tuntud oma värvikirevate õite poolest ja on väga populaarsed ilutaimed aianduses. Lisaks sellele on perekond nelk ka üks liigirikkamaid taimerühmi Euroopas, mille hulka kuulub ligikaudu sada liiki ning millest rohkem kui 70 on endeemsed (Valente et al., 2010).

Bioloogilise mitmekesisuse tekkel on üheks oluliseks protsessiks liikide radieerumine, mis seisneb ühe taksoni plahvatuslikus mitmekesistumises ja väga paljude uute liikide tekkes, mis kõik toimub evolutsioonilises mõttes lühikese ajaperioodi jooksul. Varasemalt arvati, et taimede hulgas on selline protsess levinud põhiliselt troopikas või elurikkuse tulipunktides, nagu näiteks Kapimaal Lõuna-Aafrika Vabariigis (Klak et al., 2004; Schnitzler et al., 2011). Põhjalaiustele on traditsiooniliselt peetud omaseks pigem aeglast liigiteket (Schemske, 2009; Valente et al., 2010). Perekond nelgi suur endeemsus ja paljude liikide geograafiliselt kitsas levik on aga andnud alust kahtlustada seda, et nende suure mitmekesisuse teke on aset leidnud alles hiljuti. Viimastel aastatel ongi ka Euroopast leitud väga kiireid ja ulatuslikke radieerumisi, mille üheks parimaks näiteks on perekond nelk (Valente et al., 2010).

Radieerumise kohta järelduste tegemine eeldab aga detailset arusaama uuritavate liikide fülogeneesist. Nelkide fülogeneesi on varem mitmel korral uurida üritatud, kuid siiani ei ole see vähemalt Euraasia nelkide eristamisel väga tulemuslik olnud (Fior et al., 2006; Greenberg & Donoghue, 2011; Harbaugh et al., 2010; Valente et al., 2010). Põhjuseks võib olla nelkide äärmiselt hiline radieerumine ning senikasutatud markerite liialt suur konserveeritus ja väike lahutusvõime, mistõttu ei ole olnud võimalik nelgiliikide vahelisi väikseid geneetilisi erinevusi piisavalt hästi hinnata. Samas on ka võimalik, et nende liikide väga hilise ja siiani käimasoleva lahknemise ning hübriidiseerumise tulemusel ei olegi veel tekkinud geneetilises mõttes hästi eristatavaid liike (Valente et al., 2010).

Tänu mitmete nelgiliikide endeemsusele ja väiksele geograafilisele levikule on suur osa neist kaitsealused (k.a. Eesti liigid nõmmnelk *D. arenarius* ja aasnelk *D. superbus* (eElurikkus)). Efektiivseks kaitseks on aga tarvilik detailselt mõista liikide geneetikat. Ka fülogeneesi mõistmine on liigikaitse puhul oluline, kuna tarvis on määratleda need organismirühmad, mida peab kaitse seisukohast iseseisvatena käsitlema (Frankham, 2010). Veel üheks oluliseks teguriks liikide jätkusuutlikkuse seisukohast on geneetiline mitmekesisus

(Frankham, 2005). Haruldaste liikide populatsioonide fragmenteerituse tõttu on neil väiksem populatsioonidevaheline geenivool, väiksem geneetiline varieeruvus ja suurem soodumus geneetiliseks triiviks. Väheneb heterosügootsus ja suureneb sugulusristumine, kahjulikud retsessiivsed alleelid hakkavad kuhjuma. See põhjustab omakorda probleeme seemnete ja võrsete suremuse ning isendite viljakuse ja kasvuga. Vähenenud geneetiline mitmekesisus tähendab ka seda, et taimedel ei ole piisavalt geneetilist algmaterjali, mille toel muutuvate keskkonnatingimustega kohastuda (Aguilar et al., 2008). Seetõttu ongi viimastel aastatel hakatud palju rääkima ka liigikaitse geneetilisest aspektist (Frankham, 2010; Frankham et al., 2014; Spielman et al., 2004). Väikeseid ja geneetiliselt vaesunud populatsioone on võimalik tugevdada teistest populatsioonidest pärinevate isenditega ristates, et geneetilist mitmekesisust suurendada. Samas on vaja piisavalt mõista mõlema populatsiooni geneetikat, et vältida autbriiding depressiooni, mille puhul samast liigist, kuid mittesobivate genotüüpidega isendite ristumine toob kaasa järglaste madalama kohasuse (Severns et al., 2011).

Selle taustal on oluline välja töötada nelkide geneetika uurimiseks sobivaid geneetilisi meetodeid ja markereid. Üheks laialdaselt kasutatud markeriks lähisuguluses olevate liikide ja populatsioonide uurimisel on mikrosatelliidid, mille põhiliseks eeliseks on nende suur varieeruvus ja lai levik üle kogu genoomi (Ellegren, 2004). Käesoleva magistritöö eesmärk on hinnata, kas mikrosatelliidid on sobivaks vahendiks nelkide geneetilise variatsiooni ja fülogeneesi uurimisel. Kuna perekonda nelk kuulub väga suur hulk liike nii Euroopas kui ka väljaspool, piirdub antud töö sektsiooniga *Plumaria*, mille defineeris Novák (1928), mille eeliseks on mõnede geneetiliste aspektide hea uuritus (Weiss et al., 2002).

2. Kirjanduse ülevaade

2.1 Perekond nelk

Perekond nelk (*Dianthus* L.) kuulub sugukonda nelgilised (*Caryophyllaceae* Juss.) ja seltsi nelgilaadsed (*Caryophyllales* Juss. ex Bercht. & J.Presl). See on äärmiselt liigirikas taimerühm, mille hulka kuulub umbes 300 liiki (Eichwald et al., 1971), 100 neist Euroopas (Valente et al., 2010).

Nelgid on peamiselt ühe- või mitmeaastased rohttaimed, harva ka poolpõõsad. Nende tüüpilisteks tunnusteks on sõlmekohtadest paksenenud varred, kitsad lineaalsed lehed, lõhnavad õied, mis paiknevad üksikult või tipmistes ebasarikjates õisikutes. Neil on kahe- või mitmesoomuseline lisatupp ja silinderjas õietupp, kroonlehed on peamiselt valged, roosad või punased, vahel ka kollased, nende servad võivad olla terved, hambulised või narmasjad. Pilkupüüdvate õite tõttu on paljud neist hinnatud ilutaimed aianduses, nt. aednelk (*D. caryophyllus*) ja Hiina nelk (*D. chinensis*) (Bittrich, 1993). Nelgid on levinud nii Euroopas ja Aasias (eriti Vahemere piirkonnas) kui ka Aafrikas, kuid peamiselt on tegemist siiski parasvöötme rühmaga (Valente et al., 2010).

Perekond *Dianthus* kuulub traditsioonilise klassifikatsiooni alusel sugukonda nelgilised (*Caryophyllaceae*) ja alamsugukonda *Caryophylloideae*. Nelgiliste sugukonnas olevad perekonnad ei ole aga morfoloogiliselt väga hästi defineeritud ning seetõttu on neid ka raske üksteisest eristada (Bittrich, 1993; Harbaugh et al., 2010). Monofüleetiliste rühmade eristamise teeb keeruliseks fülogeneetilisel kasulike tunnuste vähesus. Nelgiliste puhul peetakse oluliseks ka paljude tunnuste võimalikku konvergenti, nagu näiteks embrüo areng, lehe morfoloogia, kromosoomi number, õieosiste arv ning nektariumite olemasolu ja ehitus (Harbaugh et al., 2010). Kuna morfoloogiliste sünapomorfide leidmine on raskendatud, on molekulaarsed meetodid nelgiliste süstemaatikas eriti olulised (Fior et al., 2006; Harbaugh et al., 2010).

Juba esimesed nelgiliste molekulaarse süstemaatika uurimistööd näitasid, et traditsiooniline, kolmest alamsugukonnast koosnev klassifikatsioon ei pea paika (Fior et al., 2006; Smitsen et al., 2002). Seetõttu on viimastel aastatel kerkinud esile uus, 11-st triibusest koosnev nelgiliste süsteem, mille pakkusid esmakordselt välja Harbaugh et al. (2010), kasutades kolme kloroplasti geeniregiooni (matK, trnL-F, rps16). Ka hilisemad uurimused on

selle klassifikatsiooni usaldusväärsust kinnitanud (Greenberg & Donoghue, 2011). Perekond nelk asetub selle süsteemi kohaselt triibusesse *Caryophylleae*.

Mitmed uurimustööd on leidnud, et varasemalt eraldi perekonnaks peetud *Velezia* pesastub matK geeniregiooni alusel klaadi *Dianthus* sees. Kui lugeda sinna alla perekond *Velezia*, saab nelgi perekonda nimetada monofüleetiliseks (Greenberg & Donoghue, 2011; Harbaugh et al., 2010; Valente et al., 2010). Kõigele lisaks on nelgiliste hulgas teada ka mitmeid hübriidisatsiooni juhtumeid (Balao et al., 2010).

Perekond nelk on äärmiselt suur ning selle detailsele molekulaarsele süstemaatikale on kuni viimaste aastateni pööratud võrdlemisi vähe tähelepanu (Harbaugh et al., 2010). Hiljutised fülogeneetilised analüüsid on aga näidanud (Valente et al., 2010), et perekonna nelgi siseselt on viis tugeva toetusega arenguliini, mis on nii morfoloogiliselt kui ka geograafiliselt üksteisest eristunud. Suurima mitmekesisusega on Euraasia arenguliin, kuhu kuulub rohkem kui 200 liiki. Neist üle 60% on endeemsed ja on peamiselt levinud Vahemere ja Iraani-Anatoolia elurikkuse tulipunktides, kuigi need piirkonnad moodustavad vaid 10% nelgi perekonna kogulevilast. Valente et al. (2010) uuris ka nende liikide tekkekiirust ning selgus, et Euraasia liini liikide mitmekesisumisprotsess võis toimuda kiirusel 2,2 – 7,6 uut liiki miljoni aasta kohta. See tähendab, et enamus sinna kuuluvatest liikidest on eristunud 1 – 2 miljonit aastat tagasi. Samas näitas sama uuring, et liikide radieerumisprotsess pole olnud ajas ühtlane. Kuni perioodini 2 – 1,3 miljonit aastat tagasi toimus see kiirusel $0,3 \pm 0,07$ liiki miljoni aasta kohta, pärast seda toimus aga järsk lahknemise kiirenemine, kuni $2,2 \pm 0,34$ liiki miljoni aasta kohta. Selline radieerumiskiirus on võrreldav ja kohati kõrgem kui troopilistes piirkondades ja saarestikel toimunud ulatuslik ja kiire liikide lahknemine. Põhjuseid, miks just perekond nelk on muutunud niivõrd mitmekesiseks rühmaks, on raske välja tuua ning see nõuab edaspidiseid uuringuid.

Nelkide radieerumine leidis aset ajaperioodil umbes 1-2 miljonit aastat tagasi, mil Vahemere piirkonnas toimus kliimaatiline üleminek, mille tulemusel valitsevad seal nüüd põuased suved (Thompson, 2005). Valente et al. (2010) spekuleeris, et põhjuseks võib olla nelkide unikaalne kohastumine õitsemisaja suhtes. Nelkide õitseaeg jääb väljapoole põuast suve, mil tolmeldajaid leidub vähe, samas kui enamus teisi taimerühmi õitseb just suvel. Teiseks liigiteket kiirendavaks protsessiks võib pidada perekonna sees laialdaselt levinud polüploidiseerumise sündmusi (Weiss et al., 2002). Allopatrilist liigiteket, mis on endeemide

puhul peamine liigitekkemehhanism, soodustab ka Vahemereäärse piirkonna vaheldusrikas maastik (Valente et al., 2010).

Perekond nelgi sisese fülogeneesi uurimise muudab keeruliseks paljude sealsete liikide väga hiljutine ja siiani käimasolev lahknemine ning üsna dünaamiline geneetika (Valente et al., 2010). Seetõttu ei ole senised uuringud olnud väga edukad perekonnasisese fülogeneesi tuvastamisel (Fior et al., 2006; Greenberg & Donoghue, 2011; Harbaugh et al., 2010; Valente et al., 2010). Greenberg & Donoghue (2011) leiavad, et paljud nende töös kasutatud GenBank andmebaasis leiduvad nelgiliste andmed võivad olla puudulikud või valesti sisestatud, mis vähendab oluliselt nende andmete põhjal tehtud uurimuste usaldusväärsust ja kutsuvad üles kahtluse all olevaid taksonid üle kontrollima. Lisaks võib fülogeneetilise puu usaldusväärsust oluliselt mõjutada ka perekonnasisene hübriidisatsioon (Balao et al., 2010; Frajman et al., 2009; Rautenberg et al., 2008), liinide sorteerimine või horisontaalne geeniuülekanne (Kim & Donoghue, 2008; Rautenberg et al., 2008).

2.2 Sektsioon *Plumaria*

Dianthus alamseksiooni *Plumaria* defineeris morfoloogiliste tunnuste alusel Novák (1928) ning sinna kuulub umbes 10-20 liiki, maksimaalselt 30 (Kovanda, 1982; Somogyi, 2013). Novák (1928) tõi oma töös välja 9 Euroopas levivat liiki ning üle 70 nelgiliste liigisisest taksonit (alamliigid, varieteetid ja vormid) (Novák, 1928; Somogyi, 2013). On teada, et antud sektsiooni on varemgi üritatud kirjeldada ning seejuures on sektsiooni käsitletud ka eraldiseisva perekonnana (Somogyi, 2013). Kuigi mõne autori järgi kuuluvad *Plumaria* hulka ka Põhja-Aafrikas ja Himaalajas levivad liigid, on *Plumaria* siiski kõige mitmekesisem Euroopas.

Töösse kaasati 11 liiki sektsioonist *Plumaria* ning tabelis 1 on välja toodud nende morfoloogilised ja biogeograafilised tunnused. Tabelist on näha, et sektsiooni kuuluvad liigid on morfoloogiliselt väga sarnased ja selliseid tunnuseid, mis võimaldaks nende ühest eristamist, praktiliselt ei eksisteeri. Samuti pole jõutud ühisele arusaamale, millised liigid sektsiooni kuuluvad. Kui mõned autorid klassifitseerisid ühe taksoni liigiks, siis teised autorid võisid selle hinnata aga alamliigiks. Seega vajab sektsiooni morfoloogiline ja molekulaarne eristuvus täiendavat selgust (Somogyi, 2013).

Sektsiooni teeb märkimisväärseks sinna kuuluvate liikide ploidsuse uuritus (Balao et al., 2009; Weiss et al., 2002). Kui välja arvata laia levikuga *D. superbus*, on diploidsus antud sektsiooni sees pigem harv nähtus, enamik populatsioone on polüploidised. Esineb kolm erinevat ploidsusastet – diploidsus, tetraploidsus ning heksaploidsus, kuigi Ibeeria liigi *D. broteri* puhul on täheldatud lausa dodekaploidsust (12x) (Balao et al., 2009). Liigid võivad olla (a) ainult ühe ploidsusega, (b) kahe ploidsusega, aga ühe populatsiooni siseselt on ploidsus konstantne ning (c) ühe populatsiooni sees võib olla erineva ploidsusega isendeid (Weiss et al., 2002).

Sektsiooni *Plumaria* sisesel polüploidisel võib olla mitu võimalikku seletust. Tetraploidid võivad olla nii allopolüploidset (kahe erineva liigi hübriidiseerumine) kui ka autopolüploidset (sama liigi esindajate põhjal tekkinud) päritolu. Võimalikud allopolüploidiseerimise diploidset eellasliigid võisid olla *D. gratianopolitanus*, *D. monspessulanus* ssp. *monspessulanus*, *D. acicularis*, *D. arenarius*, *D. petraeus* ja *D. superbus*, juhul kui ükski eellasliikidest pole välja surnud. Pigem peetakse aga tõenäolisemaks *Plumaria* siseste liikide autopolüploidiseerumist, kuna võimalik eellasliik *D. superbus* on teistest liikidest võrdlemisi isoleeritud ja kuna paljude diploidsete liikide sees on mõnikord näha ka isendeid, kes on polüploidised (Balao et al., 2009; Weiss et al., 2002). Ka heksaploidid võivad olla moodustunud nii tetraploidide autopolüploidiseerumisel (redutseerimata gameetide kaudu) kui hübriidiseerumisel diploidse eellasliigiga. Kuna heksaploidid on levinud üle kogu *Plumaria* levikuala, peetakse siingi tõenäolisemaks autopolüploidiseerumist. Segunenud populatsioonide esinemine vihjab polüploidse üsna hilisele või lausa tänapäevasele tekkele (Weiss et al., 2002). Polüploidse tekke põhjused on veel baselged, aga selle tagajärjel tekkinud sobivad muudatused geenide paigutuses, avaldumises ja epigeneetikas, heterosügootsuse suurenemine, geenide varundamine ning väiksem konkurents võisid aidata polüploididel uutes niššides edukamad olla (Balao et al., 2011; Comai, 2005; Parisod et al., 2010; Soltis et al., 2014). Balao et al. (2011) spekuleeris, et *D. broteri* puhul on oluline polüploidiseerumisest põhjustatud fenotüüpsete tunnuste sidususe vähenemine, mistõttu saab looduslik valik kujundada fenotüüpe palju paindlikumalt. Seeläbi kasvab ka polüploidsete isendite kohasus.

Sektsioonis laialt levinud populatsioonisisest polüploidsete segunemist võib põhjendada kas suunava või tasakaalustava valikuga. Suunava valiku puhul on vastavad populatsioonid ebastabiilses olekus ja tulevikus jääb üks ploidsus teisele alla, lõhestava valiku puhul peab

leiduma mõni isoleeriv mehhanism, näiteks õitseaja erinevus (Petit et al., 1997; Vandijk et al., 1992; Weiss et al., 2002). Tasakaalustunud polümorfism võib olla kohastumus, mis aitab liigi tolerantsi piire laiendada (Keeler & Davis, 1999; Weiss et al., 2002). Olemasoleva andmestiku põhjal ei saa kindlalt öelda, kumb neist mehhanismidest nelgi puhul ploidsuste segu põhjustab (Weiss et al., 2002).

Tabel 1: Töös kasutatud liikide morfoloogilised ja biogeograafilised tunnused (Eichwald et al., 1971; Jalas & Suominen, 1986; Krall et al., 1999; Tutin et al., 1993).

Liik	Mätasus	Lehtede kuju, arv	Lehtede mõõtmed	Võsu pikkus	Varred
<i>Dianthus arenarius</i>	tihemätasjas	lineaalsed, tõmbi- või teravatipulised	15 – 35 mm × < 1 mm	10 – 30 cm	kitsad ja silinderjad, lihtsad või harunenud
<i>Dianthus gallicus</i>	hõremätasjas	tõmbi- või kergelt teravatipulised, 6 – 10-raolised	10 – 15 mm × 1,5 – 3 mm	kuni 50 cm	
<i>Dianthus gratianopolitanus</i>	hõremätasjas	lineaalsüstjad, peaaegu lamedad, 2 – 3-raolised	1 – 2 mm laiad	6 – 25 cm	siledad
<i>Dianthus monspessulanus</i>	hõremätasjas	lineaalsed kuni lineaalsüstjad, õhukesed, teravatipulised, lehetupp sama pikk kui varre diameeter	1 – 3 mm laiad	20 – 60 cm	varred kitsad, lihtsad või kergelt harunenud
<i>Dianthus moravicus</i>		lineaalsed kuni kitsalt kolmnurksed	~ 1 mm laiad	40 cm	õitseval varrel 1 – 4 lehepaari
<i>Dianthus petraeus</i>	hõremätasjas	lehed teravnevad alates keskmest, 2 – 5-raolised		30 cm	
<i>Dianthus plumarius</i>		ainult ülemises osas kitsenenud, teravnevad	~ 1 mm laiad	40 cm	õitseval varrel 1 – 4 lehepaari
<i>Dianthus serotinus</i>		teravnevad ülemises osas	~ 1 mm laiad	40 cm	mitteharunev vars, õitseval varrel 8 – 14 lehepaari
<i>Dianthus spiculifolius</i>	hõremätasjas	teravnevad alates keskmest, 2 – 5-raolised		30 cm	
<i>Dianthus squarrosus</i>	hõremätasjas	pole grupeerunud varre alaossa, lineaalsed, narmastunud, kaardunud	10 – 20 mm pikad	15 – 30 cm	
<i>Dianthus superbus</i>		lineaalsüstjad		30 – 60 cm	roomavad, ülevalt harunevad

Tabel 1 (jätk).

Liik	Taime värvus	Õied	Lõhn	Kroonlehtede kuju	Naastu pikkus
<i>Dianthus arenarius</i>	roheline	enamasti 1, harvem 2	lõhnavad	sulgjalt narmastunud	10 – 15 mm
<i>Dianthus gallicus</i>		õied koos, 1 – 3	lõhnavad	narmastunud	10 – 15 mm
<i>Dianthus gratianopolitanus</i>	hallikas-roheline	enamasti 1	lõhnavad		7 – 15 mm
<i>Dianthus monspessulanus</i>		2 – 5, õieraod lühikesed		jagunenud kitsasteks hõlmadeks, kergelt ümara kujuga	10 – 25 mm
<i>Dianthus moravicus</i>	peaaegu hallikas-roheline	1	lõhnavad	jagunenud kitsasteks hõlmadeks	12 – 15 mm
<i>Dianthus petraeus</i>	roheline või veidi hallikas-roheline			narmastunud, hambulise või peaaegu terve servaga, kupar sama pikk või pikem kui tupp	4 – 10 mm
<i>Dianthus plumarius</i>	peaaegu hallikas-roheline	1	lõhnavad	keskelt jagunenud kitsasteks hõlmadeks	12 – 18 mm
<i>Dianthus serotinus</i>	peaaegu hallikas-roheline	tihti 1 – 5	lõhnavad	keskelt jagunenud kitsasteks hõlmadeks	12 – 18 mm
<i>Dianthus spiculifolius</i>	roheline või veidi hallikas-roheline			sügavalt narmastunud, terve servaga, kupar pikem kui tupp	10 – 15 mm
<i>Dianthus squarrosus</i>		harunenud õisik		sügavalt narmastunud	8 mm
<i>Dianthus superbus</i>		enamasti 1, harva 2		narmastunud rohkem kui veerandi võrra	15 – 30 mm

Tabel 1 (jätk).

Liik	Kroonlehtede värvus	Õietupe kuju/värv	Õietupe mõõtmed	Välistupe lehed
<i>Dianthus arenarius</i>	valge, roheliste täppidega	peaaegu silinderjas	16 – 30 mm × 2 – 4,5 mm	kujult munajad kuni äraspidimunajad, tihti lühikese teravneva tipuga
<i>Dianthus gallicus</i>	roosa	kergelt kitsenev	20 – 25 mm × 3 – 4 mm	laialt äraspidimunajad, teritunud tipuga
<i>Dianthus gratianopolitanus</i>	roosa	silinderjas, hambad munajad, tihti tõmbi otsaga	13 – 17 mm	munajad kuni äraspidimunajad, rohtjad, teritunud või ogatipuga
<i>Dianthus monspessulanus</i>	valge või roosa	peaaegu silinderjas, hambad munajassüstjad, ogatipuga	18 – 25 mm × 3 – 5 mm	munajad, lineaalse rohtja tipuga
<i>Dianthus moravicus</i>	roosa või punane	peaaegu silinderjas, hambad teravnevad, ääris kitsalt saagjas	15 – 20 mm	äraspidimunajad, tihti pügaldunud või lühidalt teravnenud tipuga
<i>Dianthus petraeus</i>	valge	keskmest altpoolt teravnevad, hambad kolmnurksed	20 – 32 mm × 3 – 5 mm	elliptilised kuni munajad, teravnevad
<i>Dianthus plumarius</i>	valge või erkroosa	peaaegu silinderjas, hambad süstjad kuni munajad, tõmbid kuni teravnenud otsaga, ääris laialt saagjas	17 – 30 mm × 4 – 6 mm	äraspidimunajad, tihti pügaldunud, lühidalt teravnenud tipuga
<i>Dianthus serotinus</i>	kreemjasvalge	keskmisest osast ülespoole kitsenev, hambad süstjad, tõmbid kuni teravnenud otsaga, ääris laialt saagjas	20 – 28 mm × 2,5 – 4 mm	äraspidimunajad, tihti pügaldunud, lühidalt teravnenud tipuga
<i>Dianthus spiculifolius</i>	roosa	silinderjas kuni kitsalt munajas, tavaliselt lilla rõngaga, hambad kolmnurksed	8 – 20 × 3 – 4,5 mm	lehed elliptilised kuni munajad, teravnevad
<i>Dianthus squarrosus</i>	valge	ülespoole kitsenev	25 × 3 mm	äraspidimunajad, ogatipuga
<i>Dianthus superbus</i>	roosa või helelilla, harva valge	ülespoole kitsenev	5 – 30 × 3 – 6 mm	munajad, lühidalt teritunud

Tabel 1 (jätk).

Liik	Välistupe pikkus	Välistupe lehekeste arv	Levik	Regioon analüüsis
<i>Dianthus arenarius</i>	¼ päristupest	2 – 4	Ida- ja Kesk-Euroopa kuni Euroopa Venemaa, Baltimaad ja Soome	Ida-Euroopa
<i>Dianthus gallicus</i>	⅕ päristupest	4	Lääne-Prantsusmaa ja Põhja-Hispaania rannik	Edela-Euroopa
<i>Dianthus gratianopolitanus</i>	⅓ – ¼ päristupest		Lõuna-Prantsusmaa ja Kesk-Euroopa	Kesk-Euroopa
<i>Dianthus monspessulanus</i>	⅓ päristupest	4	Põhja-Hispaania kuni Horvaatia	Edela-Euroopa
<i>Dianthus moravicus</i>	¼ päristupest	4	Lõuna-Tšehhi	Kesk-Euroopa
<i>Dianthus petraeus</i>	¼ – ⅓ päristupest		Balkani poolsaar, Rumeenia	Kagu-Euroopa
<i>Dianthus plumarius</i>	¼ päristupest	4	Ida- ja Kesk-Euroopa mäed, lokaalselt laialdaselt naturaliseerunud	Kesk-Euroopa
<i>Dianthus serotinus</i>	¼ päristupest	4	Ida- ja Kesk-Euroopa	Kagu-Euroopa
<i>Dianthus spiculifolius</i>	⅓ päristupest	2 – 4	Ida-Karpaadid	Kagu-Euroopa
<i>Dianthus squarrosus</i>	¼ päristupest	4	Kesk-Ukraina kuni Lääne-Kasahstan	Ida-Euroopa
<i>Dianthus superbus</i>	⅓ – ¼ päristupest	2 – 4	Üle Euroopa, v.a suur osa Lääne- ja Lõuna-Euroopast	Põhja-Euroopa, Kesk-Euroopa

2.3 Mikrosatelliidid

Kuigi kogu genoomi sekveneerimine annab suurima võimaliku koguse geneetilist informatsiooni, on selle läbiviimine enamiku uurimuste puhul liialt kallis ja tülikas. Suure osa uurimuste puhul on oluliselt lihtsam kasutada geneetilisi markereid, mis on kergesti identifitseeritavad ja kindlalt teadaoleva asukohaga DNA fragmendid (Semagn et al., 2006). Nelgi liikide eristamisel on üritatud kasutada ka rDNA ITS (*internal transcribed spacer* – mittekodeeriv transkribeeritav speisser) regiooni põhise analüüsi, kuna tegemist on fülogeneetilistes uuringutes üsna laialt kasutatava analüüsimeetodiga (Feliner & Rosselló, 2007). Selgus, et need ei sobi hiljuti lahknenu liikide eristamiseks, kuna ITS-järjestused on perekonna *Dianthus* sees liiga konserveerunud (Zhang et al., 2002).

Üheks väga laialt kasutatavaks markeriks on mikrosatelliidid (Kalia et al., 2011), mis on eukarüootsete organismide DNA-s laialt levinud 1-4 (harva ka 5-6) nukleotiidi pikkused korduvjärjestused. Taolised lihtsad korduvjärjestused (tuntud ka kui *short tandem repeats* – STR või *simple sequence repeats* – SSR) võivad mingil määral esineda genoomis ka juhuslikult, kuid eukarüootidel on neid oluliselt rohkem, kui oleks sellisel puhul tõenäoline (Ellegren, 2004). Kuigi vajalik korduste arv pole kindlalt defineeritud, on mikrosatelliidi lookuse pikkus tüüpiliselt 5-40 kordust, harva ka pikem (Selkoe & Toonen, 2006).

Kuigi mikrosatelliitide tekkeks on välja pakutud mitmeid mehhanisme (Kalia et al., 2011), peetakse peamiseks siiski DNA replikatsioonil tuntud viga: nn. „libisenud ahela valesti paardumist” (Semagn et al., 2006). DNA-lõigu paljundamise ajal võib sünteesitav ahel originaalsest eemalduda. Kui vastavas lõigus esineb palju sarnaseid motiive, võivad ahelad taasühineda valesti, tänu ühes või teises DNA ahelas tekkivatele silmustele. Olenevalt sellest, kummas ahelas silmus tekib, saab sünteesitav motiiv kas rohkem või vähem kordi paljundatud (Ellegren, 2004; Semagn et al., 2006). Tänu sellele mehhanismile erinevad mikrosatelliitide alleelid üksteisest peamiselt pikkuse poolest, st. nad on pikkuspolümorfismid. Mikrosatelliitide tekke tõenäolisus sõltub ka taolisi vigu parandavate süsteemide efektiivsusest, mis omakorda võib sõltuda keskkonnatingimustest (Li et al., 2004). Just korduva motiivi pikkus eristab mikrosatelliite teistest taolistest, milleks on satelliit-DNA ja minisatelliidid – nende korduvate motiivide pikkused jäävad vastavalt 100 – 1000 ja 10 – 100 nukleotiidi vahele (Semagn et al., 2006).

Mikrosatelliite leidub nii tuuma, mitokondri kui ka kloroplasti DNAs (Kalia et al., 2011). Enamik neist asub genoomi mittekodeerivas regioonis, kus nende teke ja muteerumine mõjub organismi kohasusele neutraalselt. Väike osa on siiski levinud ka transkribeeritavates regioonides, kus need mängivad rolli geeniregulatsioonis, arengus ja evolutsioonis (Li et al., 2004), kuigi taimegenoomide puhul on see oluliselt vähem selge (Varshney et al., 2005). Dinukleotiidsed kordused on mikrosatelliitide puhul enimlevinud, sellele järgnevad mono- ja tetranukleotiidsed. Neist harvem esineb trinukleotiidseid kordusi. Trinukleotiidseid mikrosatelliite teatakse peamiselt kodeerivatest regioonidest, kus mono-, di- ja tetranukleotiidsed mikrosatelliidid on pärssiva valiku all, kuna nad võivad põhjustada translatsiooni raamistiku nihke (Ellegren, 2004).

Mikrosatelliitide sagedus genoomis varieerub ja võib olla oluliselt erinev ka lähedalt suguluses olevatel liikidel (Ellegren, 2004). Kuigi imetajate puhul on täheldatud, et nende sagedus korreleerub genoomi suurusega positiivselt (Tóth et al., 2000), siis taimede puhul on leitud vastupidine korrelatsioon. Selle põhjuseks võib olla asjaolu, et mikrosatelliidid on vähem levinud taime genoomide hiljuti laienenud regioonides, nt. retrotransposoonides (Morgante et al., 2002). Samuti, kui teiste organismide puhul on kõige rohkem levinud (CA)_n, siis taimede puhul esineb kõige rohkem hoopis (AT)_n motiive (Lagercrantz et al., 1993; Powell et al., 1996). Selline organismirühmade vaheline mikrosatelliitide esinemismustrite varieeruvus näitab, et erinevad on ka mehhanismid, mille tulemusel taolised korduvjärjestused tekivad või säilivad.

Mikrosatelliitidel on mitmeid häid omadusi, mis on need muutnud populaarseteks markeriteks taimegeneetikas (Kalia et al., 2011). Nende suureks eeliseks on nende varieeruvus, olles ühed genoomi kõige varieeruvamad regioonid (10^{-2} kuni 10^{-6} mutatsiooni ühe lookuse ja generatsiooni kohta (Schlötterer, 2000), eriti kui konkreetsetes lookuses on üle kümne motiivikorduse (Queller et al., 1993). Tänu sellele on need markerid tihti polümorfsed isegi lähedalt suguluses olevate liinide vahel, mistõttu on need heaks meetodiks, mis sobivad lähedalt seotud organismide uurimiseks (Merritt et al., 2015; Selkoe & Toonen, 2006; Zane et al., 2002). Teiseks suurimaks eeliseks on mikrosatelliitide levik üle kogu genoomi. See võimaldab kasutada paralleelselt mitut lookust, mis tähendab, et ühe analüüsi tulemusel on võimalik saada väga lai statistiline valim. Seetõttu on ka nende põhjal tehtud järeldused statistiliselt väga usaldusväärsed, ka võrreldes teiste multilookuselist markeritega (Gerber et al., 2000; Selkoe & Toonen, 2006). Näiteks riisi genoomist on leitud nõnda palju mikrosatelliite, et sobivatest lookustest on siiani vaja olnud kasutada vaid väheseid, mis näitab antud meetodiga tehtud geneetiliste uuringute laia potentsiaali paljude organismide puhul (Semagn et al., 2006). Mikrosatelliitide ja kõigi DNA markerite eelis valgupõhiste markerite ees on DNA suhteline stabiilsus, mistõttu on võimalik proove säilitada lihtsates lahustes, näiteks etanoolis. Sekveneeritud lookuste ees on mikrosatelliitide eeliseks nende lühike pikkus, mistõttu on oluliselt tõenäolisem, et nende amplifitseerimine õnnestub ka degradeerunud DNAs. See aga võimaldab kasutada odavamaid ja kiiremaid amplifitseerimismeetodeid või vähem kvaliteetsemaid DNA-allikaid, näiteks setetes säilinud DNA (Taberlet et al., 1999). Selliste proovide puhul, kus probleemiks võib olla kõrvaliste liikide DNA-ga saastumine, tuleb kasuks mikrosatelliitide praimerite spetsiifilisus (Selkoe & Toonen, 2006). Mikrosatelliitanalüüsi saab

läbi viia väikese DNA kogusega, see on reprodutseeritav ning seda on võimalik üsna efektiivselt automatiseerida, mistõttu on sellega lihtne suurt analüüsides hulka läbi viia (Semagn et al., 2006).

Mikrosatelliitidest kasutatakse kõige enam dinukleotiidsid, seejärel trinukleotiidsid ja tetranukleotiidsid kordusi. Mononukleotiidsed mikrosatelliitidega on tihti probleeme amplifitseerimisel, lisaks on nende järjestused lühemad, mistõttu on nende evolutsiooni uurimiseks ka vähem materjali (Li et al., 2002; Selkoe & Toonen, 2006). Mikrosatelliitide servades paiknevad väiksema varieeruvusega konserveerunud regioonid, mille baasil on võimalik luua ühele liigile või perekonnale sobivaid praimereid. Vastavas lookuses oleva mikrosatelliidi uurimiseks ja selle abil organismide genotüübi määramiseks on vajalik taoliste praimerite abil läbi viia polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR). Tänu valdavale pikkuspolümorfismile on võimalik erinevaid polümeraase eristada geelelektroforeesil, mistõttu on antud meetod oluliselt soodsam kui kogu genoomi sekveneerimine (Selkoe & Toonen, 2006).

Varieeruvus on mikrosatelliitide kasutamisel aga mitte ainult eeliseks, vaid ka raskuseks. Tänu mikrosatelliitide paiknemisele varieeruvates geeniregioonides ei ole võimalik kasutada nende uurimiseks universaalseid konserveerunud praimereid, nagu seda tehakse näiteks mitokondriaalse DNA sekveneerimisel. Iga liigi kohta on vajalik leida spetsiifilised praimeripaarid, millele vastavad lookused peavad asuma piisavalt kõrge varieeruvusega genoomiregionis. Samas peavad nende läheduses asuma suhteliselt konserveerunud järjestused, mida oleks võimalik kasutada kogu organismirühma jaoks töötavate praimeritena (Selkoe & Toonen, 2006). Nende kasutamise otstarbekus sõltub ka mitmete selliste lookuste leidmises, milles paiknevate alleelide pikkusvahemikud ei kattu omavahel ja mida on võimalik võrdväärse efektiivsusega võimendada, et oleks võimalik mitme praimeriga korraga analüüsi läbi viia (Semagn et al., 2006).

Lühikese korduva motiiviga pikkuspolümorfide juures on lisavaks raskendavaks asjaoluks erinevate pikkuste väike vahe, mistõttu võib olla analüütiliselt keerukas nende eristamine ja saadud andmete võrdlemine teistes laborites tehtuga (Semagn et al., 2006). Mikrosatelliitide mutatsioonimehhanismid ei ole veel täielikult selged (Ellegren, 2004), mis võib põhjustada vigu näiteks alleelisageduse meetodites, mis toetuvad kindlale

mutatsioonimehhanismi mudelile (Selkoe & Toonen, 2006). Kuna geelelektroforees suudab eristada vaid pikkuspolümorfismi, on selle tulemusel interpreteeritud geneetiline varieeruvus tõelisest väiksem, kuna olemas on ka pikkuses mitte avalduv polümorfism, nn. homoplaasia. Homoplaasia võib olla põhjustatud nii nukleotiidjärjestuse erinevusest kahe sama pikkusega alleeli vahel kui ka „tagasimuteerumisest”, st. sellest, kui varem eristunud alleel muteerub tagasi eellasalleeliga identseks. See probleem on eriti märgatav fülogeneesi rekonstrueerimisel (Estoup & Angers, 1998), aga esineb kõigi markerite, mitte ainult mikrosatelliitide puhul (Selkoe & Toonen, 2006).

Tänu nende suurele varieeruvusele ja laiale levikule genoomis on mikrosatelliidid sobivad mitmete perekonnasiseste või populatsioonivaheliste lühikest ajaskaalat hõlmavate taimegeneetiliste küsimuste lahendamisel. Mikrosatelliidid on laialdaselt kasutusel isenditevahelise suguluse mõõtmisel (Semagn et al., 2006), taimepopulatsioonide geneetilise varieeruvuse määramisel, taimesortide tuvastamisel, hübriidisatsiooni hindamisel (Powell et al., 1996), taimede soo molekulaarsel määramisel (Fraser et al., 2009) ning geneetisel kaardistamisel (Kalia et al., 2011). Võimalik on välja töötada ka selliseid mikrosatelliitmarkereid, mis on seotud kindlate fenotüüpiliste omadustega ja mille abil saab oluliselt kiirendada sordiarretust (Varshney et al., 2009). Mitokondriaalsete ja kloroplasti mikrosatelliitide kasutamise eelis on vastava DNA edasikandumine ainult üht vanemliini pidi, sealse geenijärjekorra konserveeritus ning rekombinatsiooni puudumine, mistõttu on seal paiknevad mikrosatelliidid eriliselt sobivad fülogeneesi ja migratsiooni rekonstrueerimiseks (Kalia et al., 2011).

Traditsiooniliselt on praimerite väljatöötamine olnud pikaldane, raske ja kallis protsess, seisnedes suuresti juhuslike katsete meetodil (Glenn & Schable, 2005; Zane et al., 2002). Siiski, kuna mikrosatelliidid on läinud väga laia kasutusse meditsiinis, on praimerite väljatöötamine muutunud rutiinseks protsessiks, millega tegelevad mitmed kommertsettevõtted. Samuti on tänapäeval üha populaarsemaks muutuva uue põlvkonna sekveneerimise tehnoloogia (*NGS – next generation sequencing*), mille abil on võimalik leida väga palju erinevaid praimeripaare vähese vaevaga, mistõttu ei ole enam tegemist väga suure probleemiga (Ekblom & Galindo, 2011; Merritt et al., 2015; Zalapa et al., 2012).

3. Materjal ja metoodika

3.1 Taimne materjal

Töös kasutatud taimne materjal on tellitud seemnetena Euroopa 11 riigist 12 botaanikaaiast (Tabel 2). Mitmete analüüsi kaasatud isendite puhul on teada vaid päritoluriik. Seemnepakke säilitati toatemperatuuril kuivades tingimustes. Seemned idandati kasvuhoones 2010. aasta kevadel, valiti välja kõige elujõulisemad isendid ning need istutati pottidesse, mis tõsteti taimede arenedes välitingimustesse. Kui isendid olid saavutanud generatiivse ja morfoloogilise küpsuse, koguti 2010. aasta juulis ja 2014. aasta septembris isendite herbaarmaterjal, määrati liik ning valiti välja analüüsis kasutatavad isendid. Igalt isendilt võeti leheproov, mis märgistati indiviidi koodiga, pakiti pabersalvräti tüki sisse ning hoiustati silikageelis kuni proovi kuivamiseni. Liikide määramisel lähtuti eelkõige Flora Europaea Edition 2 (Tutin et al., 1993) liigikirjeldustest. Analüüside käigus korrigeeriti isendite liigimääranguid, kuna selgus, et mõne isendi puhul botaanikaaedade poolt antud liigimäärang ei vastanud tegelikule liigile. 2010. aastal koguti proovid 86-lt isendilt ning 2014. aastal veel 11-lt isendilt. Töö on teostatud peamiselt Ave Jalaka poolt, hiljem lisandunud 11 isendi proovid on võetud ning analüüsitud autori poolt. Andmeanalüüsi on osaliselt kaasatud Kadi Rammuli (2011) poolt kogutud ja tema esitatud andmed aasnelgi (*D. superbis*) Eesti populatsioonidest (6 isendit erinevatest populatsioonidest). Samuti on andmeanalüüsis kasutatud Tiina Kerovi (2014) poolt kogutud ning tema magistritöös välja toodud ühe indiviidi andmed, mida on kasutatud heuristilises analüüsis välisrühmana.

Tabel 2: Töös kasutatud liikide nimed, isendite arv, päritolu ning määratud regioon analüüsis, samuti on välja toodud Weiss et al. (2002) artiklis esitatud liikide arvatavad ploidsused.

Liik/lühend	Botaanikaad/ kogumiskoht	Isendite arv	Botaanikaad/ kogumiskoha riik	Regioon analüüsis	Lühend	Ploidsus (2n)
<i>D. arenarius</i>	Bayreuth	6	Saksamaa	Ida-Euroopa	AreBay	
	Kokku:	6				30/60/90
<i>D. gallicus</i>	Antwerpen	4	Belgia	Edela-Euroopa	GalAnt	
		2	Rumeenia	Edela-Euroopa	GalRom	
	Kokku:	6				45/60/90
<i>D. gratianopolitanus</i>	Alpino Rezia	1	Itaalia	Kesk-Euroopa	GraAlp	
	Rennsteiggarten	3	Saksamaa	Kesk-Euroopa	GraRen	
	Bayreuth	3	Saksamaa	Kesk-Euroopa	GraBay	
		3	Poola	Kesk-Euroopa	GraPol	
	Praha	2	Tšehhi	Kesk-Euroopa	GraPra	
	Kokku:	12				30/60/90
<i>D. monspessulanus</i>	Alpino Rezia	5	Itaalia	Edela-Euroopa	MonAlp	
	Antwerpen	4	Belgia	Edela-Euroopa	MonAnt	
	Rennsteiggarten	2	Saksamaa	Edela-Euroopa	MonRen	
	Siauliai	4	Leedu	Edela-Euroopa	MonSia	
		1	Rumeenia	Edela-Euroopa	MonRom	
	Kokku:	16				30/60/90
<i>D. moravicus</i>		4	Tšehhi	Kesk-Euroopa	MorCze	
	Bayreuth	4	Saksamaa	Kesk-Euroopa	MorBay	
	Kokku:	8				60/90
<i>D. petraeus</i>	Alpino Rezia	6	Itaalia	Kagu-Euroopa	PetAlp	
	Siauliai	1	Leedu	Kagu-Euroopa	PetSia	
		1	Saksamaa	Kagu-Euroopa	PetGer	
	Kokku:	8				30/60/90
<i>D. plumarius</i>	Akureyri	2	Island	Kesk-Euroopa	PluAku	
	Gdanski	3	Poola	Kesk-Euroopa	PluGda	
		3	Saksamaa	Kesk-Euroopa	PluGer	
		1	Rumeenia	Kesk-Euroopa	PluRom	
	Alpino Rezia	6	Itaalia	Kesk-Euroopa	PluAlp	
	Kokku:	15				30/60/75/90

Tabel 2: jätk.

Liik	Botaanikaad/ kogumiskoht	Isendite arv	Botaanikaad/ kogumiskoha riik	Regioon analüüsis	Lühend	Ploidsus (2n)
<i>D. serotinus</i>	Bayreuth	4	Saksamaa	Kagu-Euroopa	SerBay	
	Kokku:	4				60/90
<i>D. spiculifolius</i>	Kovac Pal	2	Leedu	Kagu-Euroopa	SpiKov	
		2	Rumeenia	Kagu-Euroopa	SpiRom	
	Kokku:	4				60/90
<i>D. squarrosus</i>		4	Ukraina	Ida-Euroopa	SquUnk	
	Graitenerie	3	Prantsusmaa	Ida-Euroopa	SquGra	
	Kokku:	7				90
<i>D. superbus</i>	Alpino Rezia	4	Itaalia	Kesk-Euroopa	SupAlp	
	Oulu	2	Soome	Põhja-Euroopa	SupOul	
	Potsdam	5	Saksamaa	Kesk-Euroopa	SupPot	
	Valkla	2	Eesti	Põhja-Euroopa	SupVal	
	Ihaste	2	Eesti	Põhja-Euroopa	SupIha	
	Pakri	2	Eesti	Põhja-Euroopa	SupPak	
	Kokku:	17				30/60/90
	Koguarv:	103				
		isendit				

3.2 DNA analüüs

DNA eraldati silikageelis kuivatatud taimelehtedest, vastavalt „Soltis Lab CTAB DNA Extraction“ protokoll järgi. Protokoll on koostatud Cullings (1992) ning Doyle & Doyle, (1987) järgi ning on mõeldud DNA eraldamiseks nii kuivatatud kui ka värsketest taimelehtedest. 2010. aastal kogutud proovide analüüs (k.a praimerite optimeerimine) viidi läbi Ave Jalaka poolt botaanika osakonna laboris aastatel 2010-2011. 2014. aastal kogutud proovide analüüs viidi läbi töö autori poolt aastatel 2014-2015.

DNA eraldamise protokoll:

1. Igast leheproovist kaaluti ca 20 mg materjali steriilsetesse tuubidesse ja purustati.

2. Igasse tuubi lisati 500 µl 0,04 g/ml PVP lahust CTAB-puhvris (millele lisati β-merkaptotoetanooli). Segu loksutati hoolikalt ning tuubid asetati +55°C juurde üheks tunniks.
3. Proovidele lisati 500 µl kloroformi ja isoamüülalkoholi segu (24:1), raputati korralikult ning tsentrifuugiti 10 minutit 13 000 pööret/min. Tulemusena tekkis tuubi kolm kihti: pealmine vesifaas, keskmine on leheproovi jäägid ning alumine kloroform.
4. Eraldati ülemine veekiht, mis pandi uutesse tuubidesse.
5. Vastavalt vesifaasi kogusele lisati proovidele külma ammooniumatsetaati (7,5 M) ning külma isopropanooli. Proovid segati korralikult ning pandi ööseks sügavkülma.
6. Proove tsentrifuugiti 5 minutit 13 000 pööret/min ning seejärel valati ettevaatlikult tuubist ära vedelik. Tuubi põhja jäi DNA sade.
7. Lisati 700 µl külma 80% etanooli ning segati, tsentrifuugiti 3 minutit 13 000 pööret/min ning etanool eemaldati tuubist. Lisati 700 µl külma 95% etanooli, segati ning tsentrifuugiti 3 minutit 13 000 pööret/min, seejärel eemaldati ettevaatlikult tuubist etanool.
8. Proovid asetati kuumakappi umbes üheks tunniks 37°C juurde.
9. Proovidele lisati 100 µl TE puhvrit ning hoiustati üks tund 55°C juures kuumakapis.
10. Eraldatud DNA kvaliteeti kontrolliti 1% agaros-geelelektroforeesil.
11. Proove hoiustati sügavkülmas -18°C juures.

3.3 Praimerite optimeerimine ja PCR

Praimerite optimeerimine on vajalik, et leida PCR-i toimumiseks parimad tingimused, kus praimer amplifitseerub uuritava DNA-l kõige paremini. Igale praimerile on võimalik leida optimaalseid tingimusi, kuid erinevatel praimeritel on need erinevad. Tavaliselt katsetatakse seda praimerite seondumistemperatuuri või PCR-i reaktsioonisegu koostisosade koguste muutmise teel.

Molekulaarsete markeritena valiti välja 12 tuuma mikrosatelliidi praimerit, mis töötas välja Smulders et al. (2003, 2000) aednelgi (*Dianthus caryophyllus*) põhjal. 12-st praimerist 10 kaasati edasistesse uuringutesse, kuna nende puhul oli näha kõige selgemaid tulemusi ning mis on toodud välja tabelis 3. Iga praimerit jaoks leiti optimaalne temperatuur ning tuvastati

sobivaim magneesiumiallikas. Seondumistemperatuuri mõju testiti PCR-gradientprogrammiga, mille käigus katsetatakse läbi erinevad seondumistemperatuurid (vahemikus +48°C kuni +64°C). Praimeripaarist ühele lisati märgisega saba „M13“ või „CAGT“ (Tabel 4), jälgides, et praimeripaarid omavahel võimalikult vähe seonduksid. Lisatud märgis seondub PCR-i käigus fluorestseeruva märgisega, mis lisatakse eraldi PCR-i reaktsioonisegusse. Töös kasutati nelja erinevat värvi fluorestseeruvat märgist: PET (punane), VIC (roheline), FAM (sinine) ja NED (kollane). Selleks, et tuvastada kindlale lookusele vastavad alleelid ka PCR-i produktide kokku segamisel, sobitati värvid ja lookused selliselt, et lookused, mis sisaldavad sarnase pikkusega allelele, saaksid erineva värvi.

Tabel 3: Optimeerimiseks valitud praimerid, nende tähistus artiklis, nukleotiidsed järjestused ja kordusmotiivid (Smulders et al., 2003, 2000). Viimases kolmes tulbas toodud parameetrid selgitati optimeerimise käigus. F (forward) – pärisuunaline, R (reverse) – vastassuunaline.

ID	Praimeri tähistus artiklis	Praimeri nukleotiidsed järjestused (5' → 3')	Kordusmotiiv	Pikkus (bp)	Seondumistemperatuur	Mg-allikas
Di 1	MS-DCAMCRBSY	F: CAACAATGACAACAACATCAG R: TCTTCGATTGTTGAAGCT AAG	(CAA) ₁₇	90-148	50,6	MgCl ₂
Di 2	MS-DCDIA30	F: CACTGACGACACAGCTGATGT R: ACTCGTCCAAACACAAACGA	(TA) ₇₋₁	165-188	60,1	MgCl ₂
Di 4	MS-DINGSTA	F: CACAAACCTGAAAGTACGATC R: ACATTCGAGCCCTCATATAAG	(T) ₂₃₋₁	174-250	50,6	MgCl ₂
Di 5	MS-DINMADSBOX	F: ACGAGTGTCAGGATCG R: CCCCTATTGCAAACCTGC	(TA) ₇	125-175	52,4	MgCl ₂
Di 6	DCA221	F: CAACTGGTATTGAGAAGTGTTG R: AACCTTGAAATGGATTTGG	(CT) ₃₅₋₁	115-155	55,2	MgCl ₂
Di 7	DCB109	F: ATAATTCACCTTAACGGAAGGC R: AATTAAGGTCCACTACATCCC	(GT) ₂₄₋₁	90-125	60	MgSO ₄
Di 9	DCB134	F: AAGAAGCATGCAATCATCTT R: CATTACAATCATATCACCCGT	(GT) ₂₃₋₁	131-201	55	MgSO ₄
Di 11	DCB140	F: TTCTCCTTCACCTTGACTACGA R: TCCAAACTGATATTCCCATTA	(GT) ₃₉	97-179	52,4	MgCl ₂
Di 14	DCD224	F: CGTCACAAGCTCTAAATCTTT R: AACCAAAAACCCTTCTAACAC	(CTT) ₁₀	123-184	60,1	MgCl ₂
Di 16	DCF115	F: TTTACGAACAAACGATCATTT R: CCTAATCAACAACAAGTTTCTATG	(A) ₅₆₋₁₀	140-185	60	MgCl ₂

Tabel 4: Praimerite märgised

Märgise nimi	Järjestus	Kasutatud praimeritega
M13	AGGAAACAGCTATGACCAT	Di 2, Di 4, Di 5
CAGT	ACAGTCGGGCGTCATCA	Di 1, Di 6, Di 7, Di 9, Di 11, Di 14, Di 16

PCR teostati 10 µl reaktsioonisegus, eraldatud DNA lahjendati kümnekordselt TE-puhvris ja kasutati märklaud-DNA-na. Märgistatud praimerid lahjendati 0,5 mM, märgistamata 5 mM (Mcglaughlin et al., 2008).

PCR reaktsioonisegu koostis:

- 6% GoTaqFlexi puhvrit (10x)
- 12% MgSO₄ (25mM)/16% MgCl₂ (25 mM)
- 6% dNTP lahust (2,5 mM igat nukleotiidi, kokku 10 mM)
- 5% pärisuunalist praimerit
- 5% vastassuunalist praimerit
- 5% fluorestseeruvat märgist (PET, VIC, NED või FAM)
- 0,5% BSA (veise seerumi albumiin, 100x)
- 0,5% HOT FIREPol DNA polümeraasi (5U/µl)
- 20-30% analüüsitavat-DNA-d
- Ülejäänud osa destilleeritud vett

Proovid amplifitseeriti termotsükleris järgmise programmi järgi:

1. Algne denaturatsioon 95°C 5 minutit
2. Denaturatsioon 95°C 1 minut
3. Praimerite seondumine optimeeritud temperatuuril 1 minut
4. Ahelate pikendamine 72°C 1 minut
5. 2.-4. etapi kordamine 35 korda (35 tsükli)
6. Lõplik DNA ahelate pikendamine 72°C 30 minutit

Saadud PCR-i produktid kontrolliti geelelektroforeesil ning säilitati sügavkülmas -18°C juures.

3.4 Fragmentanalüüs

Fragmentanalüüsiks valmistati ette PCR-i produktid vastavalt Mcglaughlin et al. (2008) protokollile. Kõigist uuringusse kaasatavatest PCR-i produktidest tehti 10x lahjendused ning need segati kokku skeemi põhjal, mis koostati vastavalt amplifitseeritud lõikude pikkustele. Järgmiseks tehti Hi-Di formamiidist ja suurusstandardist (LIZ500) lahus, mis segati hoolikalt ning millest kanti 10 µl igasse mikrotiiterplaadi kaevu. Seejärel lisati 1,2 µl PCR-i produktide segu (Mix 1 või Mix 2) igasse kaevu.

Mikrosatelliitide fragmentanalüüs viidi läbi Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituudis kapillaarsekvenaatoriga ABI 3730xl DNA Analyzer.

3.5 Andmeanalüüs

Fragmentanalüüsil saadud tulemusi analüüsiti programmis Peak Scanner Software version 1.0 (Applied Biosystems), kus suurusstandardiks oli LIZ500. Programmi abil on võimalik tuvastada amplifitseerunud DNA lõikude pikkuseid.

Andmeid analüüsiti binaarandmetena, kuna enamike kasutatud isendite täpseid ploidsusi polnud teada, mistõttu oleks alleelandmete kasutamine riskantne olnud. Samuti ei ole eri ploidsusega isendite võrdlemine alleelandmetena võimalik ja tetraploididest suurema ploidsusega isendite andmete analüüsiks puuduvad üldse võimalused. Isendid grupeeriti kolmel eri viisil: liikide, botaanikaaedade ning liikide ja neile määratud regioonide kaupa (Tabel 2). Regioonid valiti nelgi liikide looduslike levilate järgi (Jalas & Suominen, 1986). Oluline oli koostada piisava suurusega grupeeritud, et enamusse neist saaks kaasata rohkem kui üht liiki. Samas ei tohtinud regioonid olla nii suured, et nad üksteisest ei eristuks ja pidi olema tõenäoline, et sinna kuuluvad liigid omaksid üksteisega mingil määral kokkupuudet. Selle tulemusena loodi viis regiooni: Põhja-, Ida-, Kesk-, Kagu- ja Edela-Euroopa (Tabel 2).

Andmete analüüsiks kasutati MS Exceli-põhist programmi GenAlEx 6.502 (Peakall & Smouse, 2012, 2006; Smouse et al., 2015). GenAlExi abil arvutati isendite vahelised geneetilised distantid (GD) ning teostati kõigi kolme grupeeringu alusel peakoordinaatanalüüsi graafikud (PCoA). AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) funktsiooniga teostati

geneetilise varieeruvuse analüüs liikide-, botaanikaaedade/kasvukohtade- ja regioonide siseselt ja -vaheliselt.

Samuti kasutati andmeanalüüsiks Arlequin v 3.5 (Excoffler & Lischer, 2010), mille abil tuvastati polümorfsete lookuste arvud, arvatavad liikide heterosügootsuse keskmised ja standardhälbed ning haplotüüpide arv.

Fülogeneetiliste suhete analüüsimiseks kasutati programmi PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) 4.0a147 (Swofford, 2003). Fülogeneetilised puud koostati nii feneetiliste, nagu lähimsideme (*Neighbour Joining* – NJ) ja kesksideme meetoditega (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* – UPGMA), kui ka fülogeneetiliste meetoditega, siinkohal heuristilise otsingu meetodil (10 000 kordust). Leitud dendrogrammi harude toetust hinnati kingapaela ehk *bootstrap* meetodiga (1000 kordust). Välja arvutati erinevad näitajad, näiteks püsivusindeks CI (*consistency index*), mis väljendab paralleelsuse ning reversionide olemasolu puus, ja ka RI (*retention index*), mis kõrvutab tegelike muutuste arvu andmetes maksimaalse potentsiaalsete muutuste arvuga. Mõlemad parameetrid varieeruvad nullist üheni. Puude redigeerimiseks kasutati programmi FigTree versioon 1.4.2 (Rambaut et al., 2015).

4. Tulemused

Töös analüüsiti 103 isendi kümmet lookust, kust tuvastati 146 erinevat alleeli. Lookuste varieerumistase oli väga erinev. Kõige suurem varieeruvus esines Di 16 lookusel, millel tuvastati 22 erinevat alleeli ning väikseim varieeruvus Di 2 lookusel, millel tuvastati 6 alleeli. Keskmiselt oli alleelide arv lookuses 15 alleeli.

Programmipaketi Arlequin abil arvutati liigisiselt polümorfsete lookuste arv, geenikoopiate arv, mis võrdus alati isendite arvuga ning arvatav heterosügootsus. Tulemused on toodud välja tabelis 5.

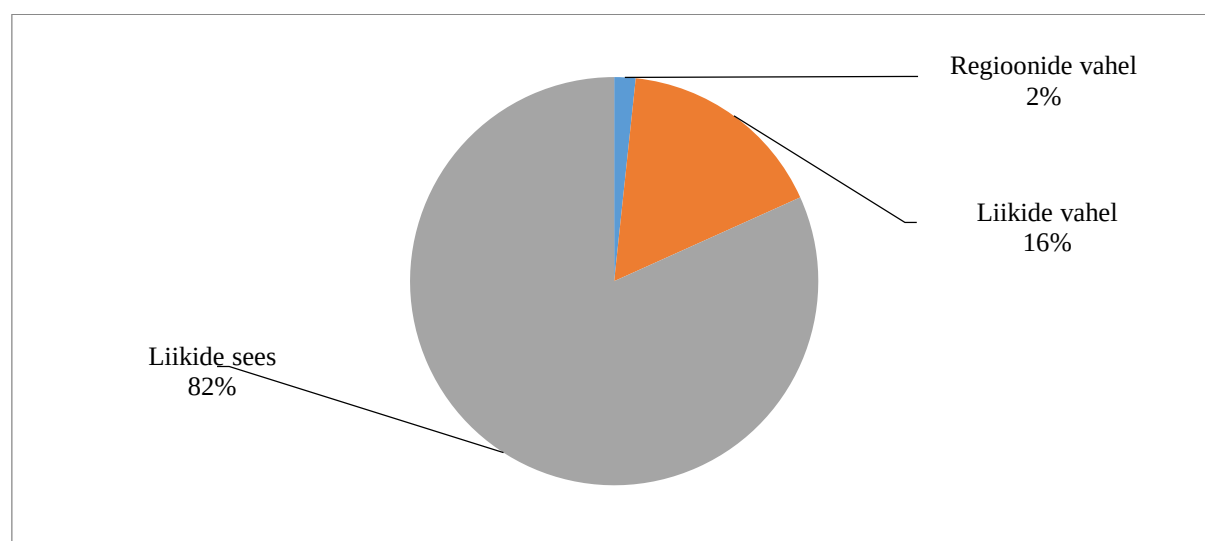
Tabel 5: Programmi Arlequin abil leitud liikide sisese geneetilise varieeruvuse näitajad. Lookuste arv oli 146.

Liik	Isendite arv	Polümorfsete lookuste arv	Haplotüüpide arv	Arvatav heterosügootsus	
				Keskmine	Standardhälve
<i>D. arenarius</i>	6	43	6	0,424	0,11
<i>D. gallicus</i>	6	48	6	0,448	0,114
<i>D. gratianopolitanus</i>	11	71	11	0,35	0,126
<i>D. monspessulanus</i>	16	89	16	0,288	0,151
<i>D. moravicus</i>	8	43	8	0,416	0,136
<i>D. petraeus</i>	8	43	8	0,372	0,122
<i>D. plumarius</i>	10	71	10	0,359	0,137
<i>D. serotinus</i>	9	54	9	0,382	0,133
<i>D. spiculifolius</i>	4	32	4	0,557	0,08
<i>D. squarrosus</i>	7	33	7	0,47	0,121
<i>D. superbis</i>	17	53	17	0,321	0,163

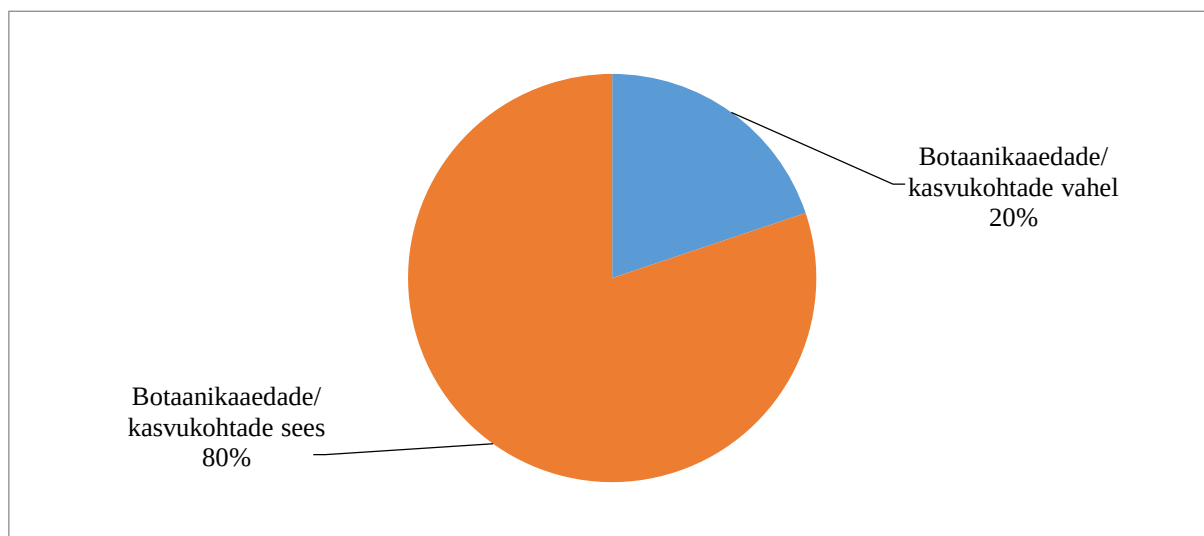
Molekulaarse varieeruvuse analüüs (AMOVA) viidi läbi nii liigi ja regiooni kui ka botaanikaedade /kasvukohtade põhise, kasutades programmi GenAlEx (Tabel 6). Geneetiline varieeruvus jaotus esimesel juhul järgnevalt: regioonide vahel 2%, liikide vahel 16% ja liikide sees indiviidide vahel 82% (Joonis 1). Botaanikaedade/kasvukohtade vahel oli variatsiooni 20%, nende sees indiviidide vahel aga 80% (Joonis 2). Kõigil juhtudest oli varieeruvus seletatud statistiliselt olulisel määral ($p < 0,001$).

Tabel 6: AMOVA analüüsi tulemused. df – vabadusastmete arv, SS – ruutude summa, MS – SS/df, Φ – fikseerumisindeks, $\Phi_{RT} = AR/(WP + AP + AR) = AR/TOT$; $\Phi_{PT} = (AP + AR)/(WP + AP + AR) = (AP + AR)/TOT$, AR – varieeruvus regioonide vahel, AP – varieeruvus liikide vahel, WP – varieeruvus liikide sees, TOT – varieeruvus kokku.

Varieeruvuse tase	df	SS	MS	Varieeruvus	Varieeruvuse osakaal	Φ	p
Liikide ja regioonide tasemel							
Regioonide vahel	4	129,36	32,34	0,21	2%	$\Phi_{RT} = 0,02$	0,004
Liikide vahel	7	187,86	26,84	2,04	17%	$\Phi_{PR} = 0,17$	< 0,001
Liikide sees	91	915,52	10,06	10,06	82%	$\Phi_{PT} = 0,18$	< 0,001
Kokku	102	1232,74		12,31	100%		
Botaanikaaedade/kasvukohtade tasemel							
Botaanikaaedade/ kasvukohtade vahel	19	414,03	21,79	2,44	20%	$\Phi_{PT} = 0,19$	< 0,001
Botaanikaaedade/ kasvukohtade sees	83	818,71	9,86	9,86	80%		
Kokku	102	1232,74		12,31	100%		

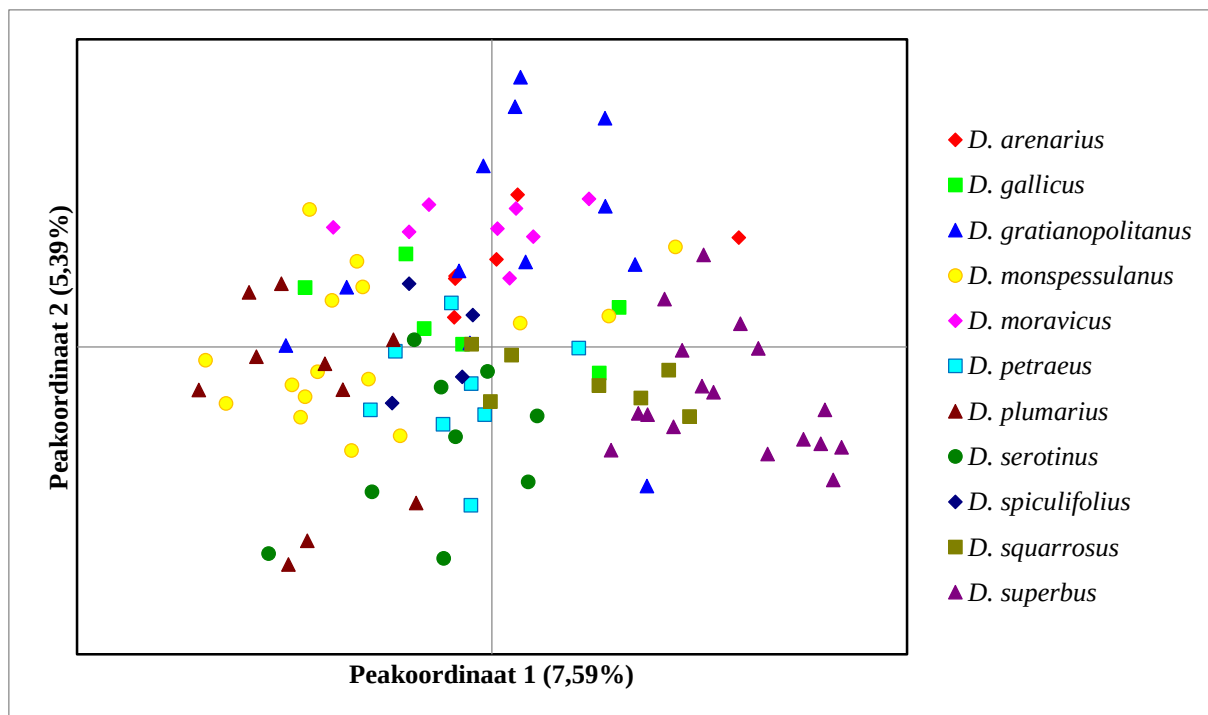


Joonis 1: AMOVA tulemused liikide ja regioonide põhiselt. Valdav enamus varieeruvusest on liikide sees (82%), vähesel määral liikide vahel (16%) ning väikseim varieeruvus on regioonide vahel (2%).

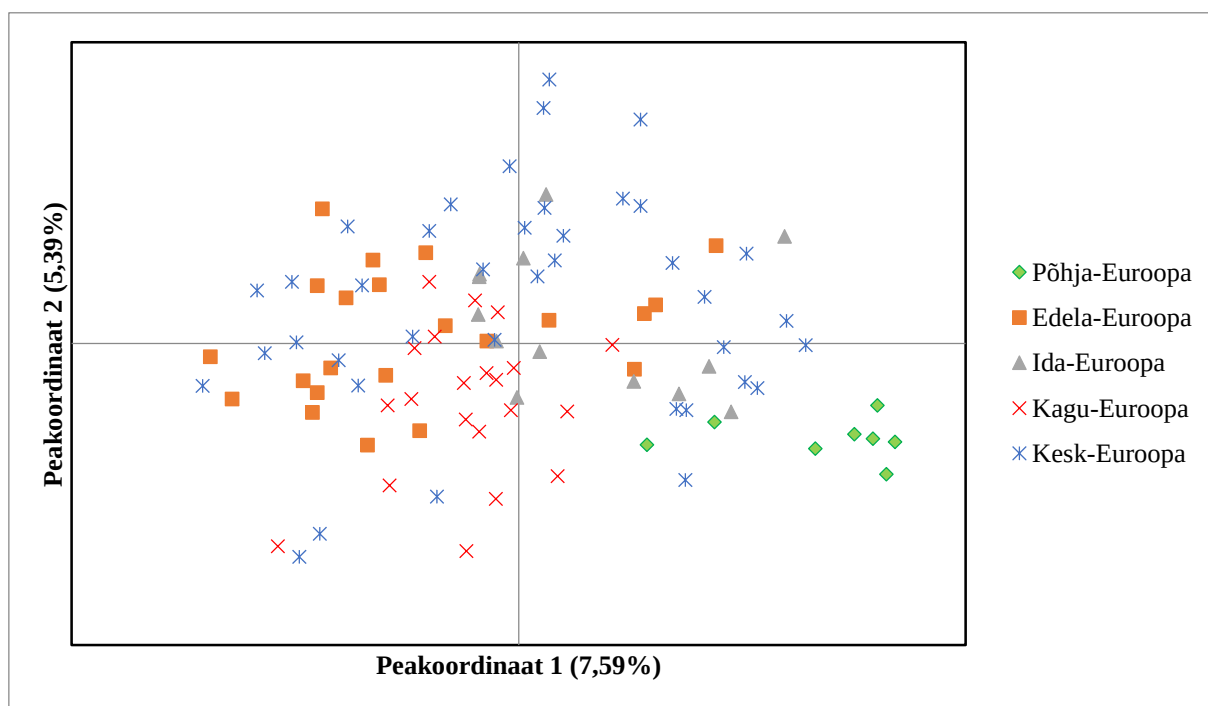


Joonis 2: AMOVA tulemused botaanikaaedade/kasvukohtade põhiselt. Enamik varieeruvusest on botaanikaaedade/kasvukohtade sisene (80%) ning 20% varieeruvusest on botaanikaaedade/kasvukohtade vaheline.

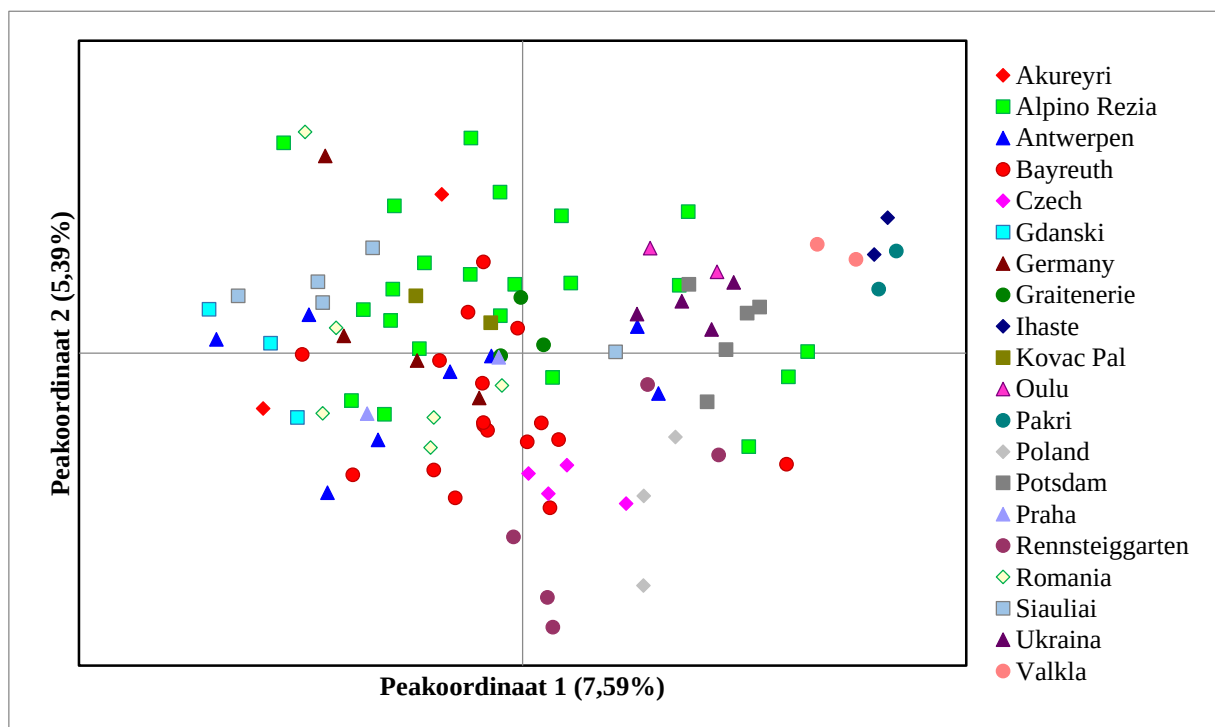
GenALExi abil viidi läbi ka peakomponentanalüüs (PCoA), kasutades eukleidilist geneetiliste distantide maatriksit Huff *et al.*, (1993) baasil. Valitud isendite rühmitused ei olnud aga väga hästi eristuvad. Teljed seletavad vaid 17,87% varieeruvusest (vastavalt 7,59%, 5,39% ja 4,89%). Omaväärtused (*eigenvalues*) telgede jaoks olid vastavalt 9,26, 6,57 ning 5,97. Tugevat klasterdumist peakoordinaatgraafikutel näha ei ole, ühegi grupeeringu vahel ei esine selgeid hiaatuseid. Siiski on näha, et enamike liikide varieeruvus on väiksem kui koguvarieeruvus (Joonis 3). Kõige selgemalt on klasterdunud *D. moravicus* ja *D. superbis*, viimase puhul just nimelt Eestist pärit isendid. Kui jätta välja mõned isendid, moodustab ka *D. monspessulanus* märgatava klatri. Regioonid eristusid samuti mõnevõrra, kuid vähemal määral. Kõige rohkem on märgata Põhja-Euroopa klasterdumist, kuid selle taga on jällegi põhiliselt Eestist kogutud *D. superbis* (Joonis 4). Ka botaanikaaedade/kasvukohade baasil ei ole võimalik tuua välja selget klasterdumist. Kogumikke moodustavad põhiliselt vaid sellised botaanikaaiad või kasvukohad, kust oli kogutud ainult kaks kuni neli isendit (Joonis 5).



Joonis 3: Peakoordinaatanalüüsi tulemus liikide põhjal.



Joonis 4: Peakoordinaatanalüüsi tulemus regioonide põhjal.



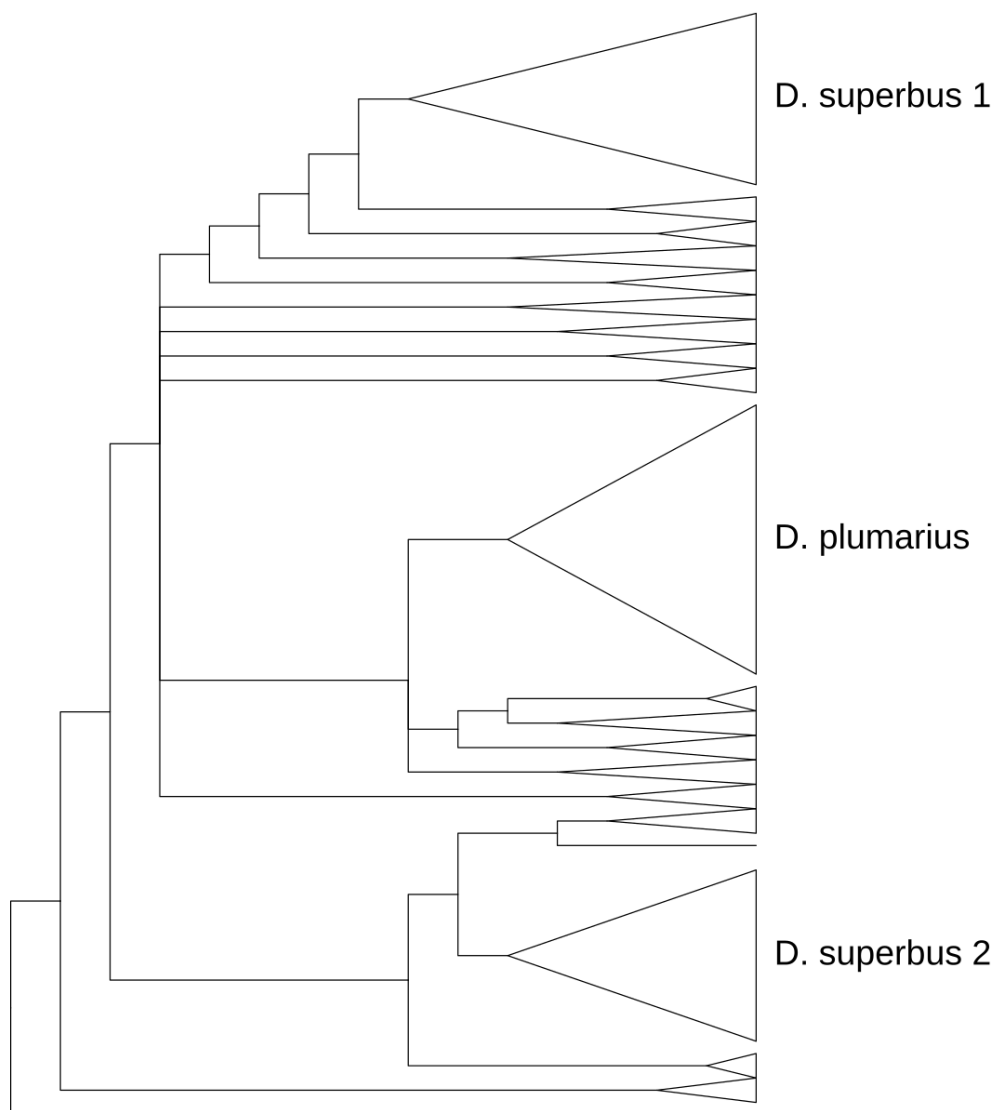
Joonis 5: Peakoordinaatanalüüsi tulemus botaanikaaedade/kasvukohtade alusel.

Feneetilist eristumist uuriti lähimsideme (NJ) ja kesksideme (UPGMA) meetoditega. UPGMA analüüs andis tulemuseks 1015 muutussammu pikkuse puu näitajatega $CI=0,1429$; $RI=0,4126$, mis on täielikult välja toodud lisas 1. NJ analüüs andis tulemuseks 982 muutussammu pikkuse puu näitajatega $CI=0,1477$; $RI=0,4348$, mis on tervikuna välja toodud lisas 2. Mõlema meetodiga loodud puudel ei eristu liigid selgetesse klasteritesse. Kuigi paljud sama liigi isendid on seotud, on seda näha peaaegu alati vaid samast botaanikaaiast pärit isendite vahel. Näiteks võiks arvata, et *Dianthus arenarius* moodustab UPGMA puus selge klasteri, aga ka siinkohal on tegemist samast botaanikaaiast (Bayreuth, Saksamaa) pärit isenditega. Mõningad erandid siiski eksisteerivad. UPGMA puul leidub näiteks klaster neljast *D. plumarius* isendist, kes kõik olid pärit eri botaanikaaedadest (Lisa 1). Samuti eristub kaks selget *D. superbis* klasterit, ühes Eestist pärinevad liigid, teises kahest erinevast botaanikaaiast pärit isendid, mis mõlemad esinevad ka NJ puul, kus nad on üksteisega seotud (Lisa 2).

Kladilistilist eristumist uuriti heuristilise otsingu meetoditega. 100% konsensuspuu oli konservatiivse hinnanguga ning on toodud tervikuna välja lisas 3 (lühivariant joonisel 7) ning 50% konsensuspuu on toodud tervikuna välja lisas 4. Heuristilises otsingus tuvastati 120

Phylogenetic tree showing relationships between various *Plu* species. The tree is rooted on the left and branches to the right. The species names are listed on the right, with some in red and some in black. The red names are *Plu*Aku017, *Plu*Gda021, *Plu*Gda018, *Plu*Gda060, *Plu*Ger067, *Plu*Rom079, and *Plu*Alp088. The black names are *Mor*Bay086, *Mon*Ant020, *Mon*Ant019, *Mon*Ant059, *Mon*Ant077, and *Plu*Alp088.

Kingapaelameetodi tulemusel leiti vaid üksikud ja väikesed üle 50% toetusega klastrid (nii 50% kui 100% konsensuspuul oli kõrgeim toetus 95%), mis on lisatud heuristilise otsingu konsensuspuudele (Lisa 3; 4), kuigi bootstrap-analüüsi toetused peaksid enamasti jääma 88 ja 100 vahele, et tõendada 95% statistiline olulisus (Zander, 2004). Peaaegu kõik taolised klastrid ühendasid vaid samast kasvukohast või botaanikaaiast pärit isendeid, erandiks olid jällegi *D. superbis* isendid, siinkohal küll ainult need, mis pärinesid Eestist.



Joonis 7: 100% heuristilise konsensuspuu koondatud variant (PAUP, pikkus 959; CI=0,1512; RI=0,4504). Väikesed kolmnurgad ühendavad täiesti erinevatest liikidest pärit isendeid või väikeseid sama liigi samast botaanikaaiast pärinevate isendite klastreid. Suurte kolmnurkadega on märgitud klastrid, milles on ülekaal erinevatest botaanikaaedadest pärinevatel sama liigi isenditel. Selliseid klastreid moodustab *D. superbus* (2 eraldi klastrit) ja *D. plumarius* (1 klaster). Kõik need klastrid sisaldavad endas ka vähesel määral teisi liike. Kõige rohkem on neid *D. plumarius* klastris.

5. Arutelu

Analüüsivõimalusi piiras oluliselt vajadus kasutada binaarandmeid, mille tingis perekond nelgi väga keeruline ploidsus. Kuigi tetraploidide uurimise meetodid on hästi välja töötatud, on heksaploidide uurimine siiani väga keeruline. Samuti ei ole võimalik võrrelda eri ploidsusega taksonite andmeid. Sektsiooni *Plumaria* liikide hulgas leidub aga nii di-, tetra-, heksa- kui ka dodekaploide (Balao et al., 2009).

Kasutatud mikrosatelliitlookuste varieeruvus ja heterosügootsus on sektsioonis *Plumaria* väga kõrge, mis on oodatav tulemus suure varieeruvusega mikrosatelliitmarkerite kasutamisel. Molekulaarse varieeruvuse analüüsil aga selgus, et valdav enamus sellest varieeruvusest esineb liikide sees, mitte liikide vahel (Joonis 1), mis seab kahtluse alla nii sektsioonis *Plumaria* defineeritud liikide tõesuse ja otstarbekuse kui ka mikrosatelliitmarkerite võime sektsioonisiseseid fülogeneetilisi küsimusi lahendada. Peakoordinaatanalüüsidel leitud madalad seletuvusprotsendid (kolme esimese telje seletusvõime kumulatiivselt jäi alla 20%) näitavad, et töös kasutatud 10 lookust näitasid niivõrd unikaalseid varieeruvuse mustreid, et neid oli raske ühiste koordinaatide alla koondada.

Uuritud liikide hulgas tõuseb esile *D. plumarius*, mille vähemalt mõnede isendite klasterdumist toetavad nii lähimsideme kui ka heuristilised puud ja mida võib seetõttu pidada teistest paremini välja kujunenud liigiks (Joonis 6; 7; Lisa 1; 3; 4). *D. superbus* isendite klasterdumine on isegi tugevamalt toetatud, seda on näha kõigi nelja koostatud puu alusel, kuigi enamikes neist moodustub kaks eraldi klastrit (Joonis 7; Lisa 1; 2; 3; 4). Võimalik, et tegemist on ülejäänud sektsioonist kõige rohkem eristunud taksoniga. Ülejäänud liigid on kõik väga halvasti klasterdunud (Joonis 7). Selle põhjuseid võib olla mitmeid ja need võivad peituda nii sektsiooni *Plumaria* enda omadustes kui ka kasutatud mikrosatelliitmarkerite ebasobivuses antud probleemi lahendamisel.

Käesolevas töös moodustatud puude püsivusindeks CI on üsna madal, mis võib viidata homoplaasiale ja tunnuste muutumise sagedusele. Samas on oluline meeles pidada, et mida kõrgemale taksonite ja tunnuste arv tõuseb (antud töös 103 ja 146), seda enam CI väärtus langeb, seega võib madal CI väärtus olla eksitav.

Oodatav tulemus on, et samast botaanikaaiast pärit sama liigi isendid on üksteisega seotud, kuna botaanikaedades võib olla tegemist väikeste ja omavahel tugevalt ristunud

populatsioonidega. On alust arvata, et analüüsi võis olla kaasatud mitmeid potentsiaalselt lähisugulasisendeid, kuna dendrogrammis tuleb selline seos tihti välja. Osalt on see usaldusväärsete tulemuste saamise koha pealt probleemne, kui isendeid on vähe ja kui nad on pärit vaid mõnest botaanikaaiast. See on probleemiks näiteks *D. squarrosus* puhul, kus seitse isendit on pärit vaid kahest erinevast botaanikaaiast, mis moodustasid selle alusel kõigis puudes klastrid (Lisa 1; 2; 3; 4). Seega selgub, et tulevastel analüüsides oleks oluline kaasata pigem võimalikult paljudest erinevatest botaanikaedadest pärinevaid isendeid, et taolist probleemi vältida.

Ka liikide erinev polüploidisus raskendab nende võrdlemist (Weiss et al., 2002). Kuigi viimasel ajal on nelkide polüploidide teket pigem seletatud autopolüploidiseerumisega (Valente et al., 2010), on siiski hübriidiseerumine nelkide hulgas tuntud ja hiljuti on leitud ka tõendeid nende allopolüploidiseerumisest (Balao et al., 2010). See on ka põhjus, miks töösse kaasati botaanikaedade ja kasvukohtade põhised tulemused. Kaua aega teiste nelgiliikide läheduses botaanikaaias kasvanud isendid ja nende seemned võivad üsna lihtsasti olla mõjutatud hübriidiseerumisest. Selline situatsioon väljendub dendrogrammil erinevast liigist, kuid samast botaanikaaiast pärinevate isendite seotuses (Lisa 1; 2; 3; 4). Konstrueeritud dendrogrammis tulid mõned sellised klasterdunud isendid välja Alpino Rezia botaanikaia puhul, kus oli näha väheste *D. monspessulanus*, *D. plumarius* ja *D. petraeus* isendite gruppi (Lisa 4). Samas ei olnud sellised klastrid piisavalt levinud, et anda alust arvata, nagu oleks botaanikaedade sisene hübriidiseerumine olnud peamiseks põhjuseks, miks liigid ei klasterdunud.

Nagu näitas Valente (2010), on sektsiooni *Plumaria* liigid väga hiljuti eristunud, kui nende eristumine veel alles käimas ei ole. Nende geneetika on väga dünaamiline ja liikide sees leidub palju varieeruvust, seega on võimalik, et need evolutsioonilises mõttes väga uued liigid ei olegi veel piisavalt palju eristunud, et see molekulaarsete meetodite abil kajastuks. Kuna sektsiooni *Plumaria* liikide siseselt on näha juhtumeid, kus ühes populatsioonis võib olla erinevate ploidsusastmetega isendeid (Weiss et al., 2002), on alust arvata, et tegemist on polüploidse-hübriidse liigikompleksiga, kus liigiteke alles toimub ning seetõttu selgeid taksoneid saabki eristada vaid üksikuid.

Oluline on ka meeles pidada, et sektsiooni *Plumaria* liigid on defineeritud vaid morfoloogiliselt, ajal mil molekulaarsed meetodeid ei olnud veel kasutuses (Novák, 1928).

Samas on nelkide morfoloogia tihti ka liigisiselt väga varieeruv (Somogyi, 2013). Võib selguda, et kasutatud morfoloogilised tunnused ei ole liikide lahknemise seisukohalt määravad ja nende tunnuste põhjal loodud seksiooni *Plumaria* sisene süsteem ei ole geneetilistelt toetatud.

Regioonide puhul võis selgete klasterdumiste puudumise põhjuseks olla valitud regioonide liigne suurus, mille aga tingis seksiooni *Plumaria* levik üle kogu Euroopa ja erinevate liikide suuresti erinevad levialad. Regioonide suuruse juures võib eksisteerida võimalus, et nende siseselt toimub juba omakorda liigiteke.

Üheks põhjuseks, miks mikrosatelliitmarkerite abil ei toimunud klasterdumist, võis olla valitud meetodi ebasobivus nelkide fülogeneetiliste suhete uurimisel. Rakutuuma mikrosatelliidid on väga suure varieeruvusega ja neid kasutatakse pigem liigi- ja populatsioonisiseste pärinevussuhete uurimiseks. Fülogeneesisuhete uurimisel peetakse palju sobivamaks kloroplastide mikrosatelliite (Wheeler et al., 2014), kuid selliseid ei ole perekond nelgi tarbeks välja töötatud. Käesolevas töös on seega kasutatud mikrosatelliite, mis loodi vaid aednelgi siseste geneetiliste suhete uurimiseks, kuigi nende töötamist katsetati ka teiste nelgiliikide peal (Smulders et al., 2000). Liiga tugev varieerumine tähendab aga, et muudatused mikrosatelliitide pikkuses „kirjutatakse üle“ (Semagn et al., 2006).

Mikrosatelliitide mittevastavust töös käsitletud probleemi lahendamiseks näitab see, et usaldusväärseid klastreid, mida toetavad mitmed puu konstrueerimise meetodid, siiski leidub, aga need on kõik väikesed grupeeringud samast botaanikaaiast pärinevaid sama liigi isendid. Seega kasutatud markerid töötavad, kuid nad suudavad lahendada vaid väga lähedaste isendite seotust. Samuti on samu markereid varem edukalt kasutatud seksiooni *Plumaria* erinevate liikide siseste pärinevussuhete uurimisel (Kerov, 2014; Rammul, 2011).

Mikrosatelliitidele tuginevat seksiooni *Plumaria* sisest fülogeneesi on üritatud rekonstrueerida ka varasemalt ning ka see ei ole toonud märgatavaid tulemusi (Somogyi, 2013). 239 Kesk-Euroopa isendil leiti kolmest lookusest (MS-DINCARACC, DCD010 ja DCA221 e. Di 6; Smulders et al., 2000, 2003) 127 erinevat alleeli ja olenemata proovitud klasterdamismeetoditest suudeti eristada vaid kolm grupeeringut. Kuna käesolevas töös on kasutatud oluliselt rohkem lookusi ja selget kolmeks grupeerumist ei nähtud, on võimalik, et

Somogyi (2013) töös kasutatud kolm lookust andsid taolise klasterdumise pigem juhuslikult ning see ei ole tõene pilt sektsiooni fülogeneesist.

Samas kasutas Somogyi (2013) oma töös ka teisi meetodeid, uurimaks sektsiooni *Plumaria* fülogeneetilisi suhteid. Võrreldes erinevaid läbi viidud analüüse, sai Somogyi (2013) kõige selgemaid tulemusi kasutades AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) analüüsi. Tulemustest eristus 4 peamist gruppi: (a) *D. plumarius* grupp, kuhu kuulusid ka kõik *D. plumarius* ja *D. serotinus* alamliigid; (b) *D. petraeus* grupp, kuhu kuulusid kõik uuringusse kaasatud Ida-Karpaatidest pärit isendid, mis klasterdusid selgelt kõigi *D. arenarius* isenditega; (c) *D. superbus* grupp, kuhu kuulusid kõik antud liigi isendid ning (d) *D. monspessulanus* grupp, kuhu kuulusid kõik antud liigi isendid ning ka *D. hyssopifolius* isendid. Samuti leidis Somogyi (2013), et *D. superbus* oli ainuke liik, mis moodustas töös esitatud fülogrammil monofüleetilise rühma.

Uuringu üheks kitsaskohaks oli ka analüüsi kaasatud isendite ebaühtlane ning sageli väike arv. Liikide eristumise ja fülogeneetiliste suhete küllaldaseks hindamine oleks lihtsam, kui kaasata analüüsi rohkem ning võimalikult mitmekesise päritoluga isendeid. Ideaalis oleks eelistatud hankida analüüsitavad proovid looduslikest populatsioonidest, mitte tellida botaanikaaedadest seemneid, kuna sel puhul ei saa kunagi kindel olla, mis päritoluga antud seemned on. Sellist laiapõhjalist uuringut on aga nii ajaliselt kui ka rahaliselt kulukas teostada ning tõenäoliselt on võimalik ka lihtsalt suurema valimiga saada oluliselt selgem tulemus.

Perekond nelgil on siiski suur potentsiaal olla materjaliks uuringutele, mis üritavad selgitada evolutsioonibioloogiliste mehhanismide, näiteks radieerumiste olemust. Võimaluse realiseerimiseks tuleb aga selle keerulise geneetikaga perekonnaga veel täiendavat tööd teha, leidmaks sobivad markerid ja metoodika, mis suudaks lahutada need väga vähe eristunud liigid, kuid ei oleks samas liialt varieeruv. Toetudes Somogyi (2013) tehtud analüüsidele, võiks edaspidi sarnastes uuringutes mõelda AFLP analüüsi teostamisele.

6. Kokkuvõte

Perekond nelk on väga liigirikas taimerühm, mille paljud liigid on geograafiliselt kitsa levikuga. On leitud, et suurem osa neist liikidest on lahknud alles hiljuti ja lühikese aja jooksul, mistõttu on perekond nelgi abil potentsiaalselt võimalik uurida elusorganismide radieerumist. Seni kasutatud molekulaarsed markerid pole aga andnud ammendavat vastust perekonnasisesest fülogeneesist ning omavahelisest eristumisest. Samuti pole neil ka üheseid morfoloogilisi tunnuseid, mille alusel neid üksteisest lihtne eristada oleks. Seega oli käesoleva töö eesmärgiks uurida mikrosatelliitanalüüsi meetodi efektiivsust hindamaks perekonna *Dianthus* seksiooni *Plumaria* sisest geneetilist variatsiooni ja fülogeneetilisi suhteid.

Analüüsi kaasati 103 isendit 11 liigist. Töö käigus uuriti kümmet tuuma mikrosatelliitlookust, kus tuvastati 146 alleeli. Andmeid käsitleti binaarandmetena, kuna enamike kasutatud isendite ploidsused polnud teada. Liikide, botaanikaaedade/kasvukohtade ja looduslike levilate alusel viidi läbi molekulaarse varieeruvuse analüüs ja uuriti liikide klasterdumist nii feneetiliste kui ka fülogeneetiliste meetodite abil.

Liigi ja regiooni põhise molekulaarse varieeruvuse analüüsist selgus, et enamik varieeruvusest oli indiviidide vahel. Peakoordinaatanalüüsi tulemusel eristusid mingil määral *D. moravicus* ja *D. superbus*, kuid enamik liike seda ei teinud. Koostatud dendrogrammid ei näidanud selget liigipõhist klasterdumist, v.a. *D. superbus* ja *D. plumarius*. Kingapaelameetod toetas vaid samast botaanikaaiast või kasvukohast pärinevate isendite seotust.

Seega selgub, et antud mikrosatelliitmarkerite abil on seksiooni *Plumaria* liikide fülogeneesi raske uurida. Üheks põhjuseks on seksiooni suhteliselt meelevaldne püstitamine, tuginedes morfoloogilistele tunnustele, mis on ka liikide sees väga varieeruvad. Nelkide hiljutise ja kiire mitmekesisistumise tõttu võivad liigid geneetiliselt veel üsna halvasti eristunud olla. Potentsiaalselt on siinkohal üheks erandiks *D. superbus* ja *D. plumarius*. Üheks probleemiks võis olla ka perekond nelgi jaoks välja töötatud markerite ebasobivus liikidevahelise fülogeneesi uurimiseks. Tuuma mikrosatelliidid on väga suure varieeruvusega, mistõttu kasutatakse neid pigem populatsioonisiseste, mitte liikidevaheliste küsimuste lahendamiseks. Seda võib arvata seetõttu, et ainult samast botaanikaaiast pärit isendid klasterdusid usaldusväärselt.

7. Summary

GENETIC VARIETY AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS WITHIN THE GENUS *DIANTHUS* L. SECTION *PLUMARIA* BASED ON MICROSATELLITE ANALYSIS

Genus *Dianthus* L. is an extremely diverse plant group and most species within the genus have an endemic area of distribution, suggesting that diversity has originated only recently and during a short period of time. This has been shown by various studies, thus it is potentially possible to use this genus in order to investigate the fundamental evolutionary mechanism of rapid diversification or radiation. The molecular methods that have been used so far have been insufficient to infer the internal phylogeny of this genus. Additionally, species within the genus lack unambiguous morphological characteristics that can be used to distinguish one from another. Thus the main aim of the thesis is to investigate the efficiency of the microsatellite analysis method in evaluating the genetic variety and phylogenetic relationships within the genus *Dianthus* L. section *Plumaria*.

103 specimens belonging to 11 species were analysed for 10 different nuclear microsatellite loci, where 146 alleles were identified. Data was treated as binary, because most of the ploidy of the specimen was not known. Phenetic and phylogenetic methods to identify the clustering of species and analysis of molecular variance were used within three major levels: species, botanical gardens/habitats and natural areas of distribution.

The analysis of molecular variance between species and natural areas of distribution showed that the majority of the variance was between individuals, not between species. The principal component analysis showed the clustering of *D. moravicus* and *D. superbus* to a small extent, however most of the species did not show any results. Similarly, composed dendrograms did not indicate clear clustering of species, except *D. superbus* and *D. plumarius*. Bootstrapping only supported the coherence of clusters of individuals which originate from the same botanical garden or habitat.

Thus it is clear that based on these given microsatellite markers it is difficult to analyse the species of section *Plumaria*. One of the reasons for this is the arbitrary distinction of section *Plumaria*, which is grounded only on morphological features, which are also very variable within the species. The reason why the species may have poor genetic differentiation is that

species within *Dianthus* have had rapid diversification within a short amount of time. The only exceptions can potentially be *D. superbus* and *D. plumarius*. One of the problems could also have been the inadequate suitability of the molecular markers developed for the genus *Dianthus* to study its internal phylogeny. Nuclear based microsatellites have great variety and for this reason they are mostly used to solve challenges within populations rather than between species. This is shown by the fact that only the individuals that originated from the same botanical garden or habitat were significantly clustered.

8. Tänuavaldused

Sooviksin väga tänada igakülgse abi ja kasulike nõuannete eest oma juhendajat Silvia Pihu, kellelt poleks antud töö valminud. Samuti sooviksin tänada Kadri Kuusksalu ja Laura Valgmad abi eest laboratoorsel tööl.

9. Kasutatud kirjandus

- Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herrerias-Diego, Y., Lobo, J., 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Mol. Ecol.* 17, 5177–5188.
- Balao, F., Casimiro-Soriguer, R., Talavera, M., Herrera, J., Talavera, S., 2009. Distribution and diversity of cytotypes in *Dianthus broteri* as evidenced by genome size variations. *Ann. Bot.* 104, 965–973.
- Balao, F., Herrera, J., Talavera, S., 2011. Phenotypic consequences of polyploidy and genome size at the microevolutionary scale: a multivariate morphological approach. *New Phytol.* 192, 256–265.
- Balao, F., Valente, L.M., Vargas, P., Herrera, J., Talavera, S., 2010. Radiative evolution of polyploid races of the Iberian carnation *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). *New Phytol.* 187, 542–551.
- Bittrich, V., 1993. Caryophyllaceae, in: Kubitzki, K., Rohwer, J.G., Bittrich, V. (Eds.), *Flowering Plants · Dicotyledons*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 206–236.
- Comai, L., 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* 6, 836–846.
- Cullings, K.W., 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol. Ecol.* 1, 233–240.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Eichwald, K., Kalamees, K., Kask, M., Krall, H., Kuusk, V., Masing, V., Paivel, A., Puusepp, V., Rimmel, A., Talts, S., Tamm, Ü., Viljasoo, L., 1971. *Eesti NSV flora*, 8th ed. Valgus, Tallinn.
- Ekblom, R., Galindo, J., 2011. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107, 1–15.
- Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5, 435–445.
- Estoup, A., Angers, B., 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: Theoretical and empirical considerations, in: Carvalho, G.R. (Ed.), *Advances in Molecular Ecology*. Ios Press, Amsterdam, pp. 55–86.

- Excoffler, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. Volume 10, p 564-567.
- Feliner, G.N., Rosselló, J.A., 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 911–919.
- Fior, S., Karis, P.O., Casazza, G., Minuto, L., Sala, F., 2006. Molecular phylogeny of the Caryophyllaceae (Caryophyllales) inferred from chloroplast matK and nuclear rDNA ITS sequences. *Am. J. Bot.* 93, 399–411.
- Frajman, B., Eggens, F., Oxelman, B., 2009. Hybrid Origins and Homoploid Reticulate Evolution within Heliosperma (Sileneae, Caryophyllaceae)-A Multigene Phylogenetic Approach with Relative Dating. *Syst. Biol.* 58, 328–345.
- Frankham, R., 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biol. Conserv.* 143, 1919–1927.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126, 131–140.
- Frankham, R., Bradshaw, C.J.A., Brook, B.W., 2014. Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biol. Conserv.* 170, 56–63.
- Fraser, L.G., Tsang, G.K., Datson, P.M., De Silva, H.N., Harvey, C.F., Gill, G.P., Crowhurst, R.N., McNeillage, M.A., 2009. A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. *BMC Genomics* 10, 102.
- Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodénès, C., Kremer, A., 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol. Ecol.* 9, 1037–1048.
- Glenn, T.C., Schable, N.A., 2005. Isolating microsatellite DNA loci., in: Zimmer, E.A., Roalson, E. (Eds.), *Molecular Evolution, Producing the Biochemical Data*, Part B. Academic Press, San Diego, USA, pp. 202–222.
- Greenberg, A.K., Donoghue, M.J., 2011. Molecular systematics and character evolution in Caryophyllaceae. *Taxon* 1637–1652.
- Harbaugh, D.T., Nepokroeff, M., Rabeler, R.K., McNeill, J., Zimmer, E.A., Wagner, W.L., 2010. A New Lineage-Based Tribal Classification of the Family Caryophyllaceae. *Int. J. Plant Sci.* 171, 185–198.
- Huff, D.R., Peakall, R., Smouse, P.E., 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theor. Appl. Genet.* 86, 927–934.
- Jalas, J., Suominen, J., 1986. *Atlas Florae Europaeae: Distribution of vascular plants in Europe, Caryophyllaceae (Silenoideae)*. Helsinki.

- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K., 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177, 309–334.
- Keeler, K.H., Davis, G.A., 1999. Comparison of common cytotypes of *Andropogon gerardii* (Andropogoneae, Poaceae). *Am. J. Bot.* 86, 974–979.
- Kerov, T., 2014. Nõmmnelgi (*Dianthus arenarius* L.) alamliikide geneetiline varieeruvus. Magistritöö. http://dspace.ut.ee/bitstream/handle/10062/42640/Kerov_ma_2014.pdf (2016-05-20). Tartu Ülikool, Tartu.
- Kim, S.-T., Donoghue, M.J., 2008. Incongruence between cpDNA and nrITS trees indicates extensive hybridization within Eupersicaria (Polygonaceae). *Am. J. Bot.* 95, 1122–1135.
- Klak, C., Reeves, G., Hedderson, T., 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature* 427, 63–65.
- Kovanda, M., 1982. *Dianthus gratianopolitanus*: variability, differentiation and relationships. Preslia.
- Krall, H., Kukk, T., Kuusk, V., Leht, M., Oja, T., Reier, Ü., Sepp, S., Zingel, H., Tuulik, T., 1999. Eesti taimede määraja. Eesti Loodusfoto, Tartu.
- Lagercrantz, U., Ellegren, H., Andersson, L., 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21, 1111–1115.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453–2465.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E., 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21, 991–1007.
- McGlaughlin, M.E., Wallace, L.E., Helenurm, K., 2008. Permanent genetic resources: Isolation of microsatellite loci from the endangered plant *Sibara filifolia* (Brassicaceae). *Mol. Ecol. Resour.* 8, 367–369.
- Merritt, B.J., Culley, T.M., Avanesyan, A., Stokes, R., Brzyski, J., 2015. An Empirical Review: Characteristics of Plant Microsatellite Markers That Confer Higher Levels of Genetic Variation. *Appl. Plant Sci.* 3, 1500025.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W., 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.* 30, 194–200.
- Novák, F.A., 1928. *Dianthi fimbriati europaei*. I., II. *Repert. Specierum Nov. Regni Veg.* 25, 38–47, 204–208.
- Parisod, C., Holderegger, R., Brochmann, C., 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol.* 186, 5–17.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28, 2537–2539.

- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6, 288–295.
- Petit, C., Lesbros, P., Ge, X.J., Thompson, J.D., 1997. Variation in flowering phenology and selfing rate across a contact zone between diploid and tetraploid *Arrhenatherum elatius* (Poaceae). *Heredity* 79, 31–40.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J., 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1, 215–222.
- Queller, D.C., Strassmann, J.E., Hughes, C.R., 1993. Microsatellites and kinship. *Trends Ecol. Evol.* 8, 285–288.
- Rambaut, A., Bogaardt, C., Dudas, G., Fagundes de Carvalho, L., Hall, M., Wikramaratna, P., Bedford, T., Bollback, J., Hedge, J., Lycett, S., Raghwan, J., Welch, J., 2015. Figtree Version 1.4.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (2016-05-18).
- Rammul, K., 2011. Ümberasustatud aasnelgi (*Dianthus superbus* L.) populatsiooni geneetiline varieeruvus võrreldes looduslike populatsioonidega. http://www.botany.ut.ee/kaitsmised_2011/kadi_rammul_mag.pdf (2016-05-19) (Magistritöö). Tartu Ülikool, Tartu.
- Rautenberg, A., Filatov, D., Svennblad, B., Heidari, N., Oxelman, B., 2008. Conflicting phylogenetic signals in the *SLX1/Y1* gene in *Silene*. *Bmc Evol. Biol.* 8, 299.
- Schemske, D.W., 2009. Biotic interactions and speciation in the tropics, in: *Speciation and Patterns of Diversity*, Ecological Reviews. Cambridge University Press.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365–371.
- Schnitzler, J., Barraclough, T.G., Boatwright, J.S., Goldblatt, P., Manning, J.C., Powell, M.P., Rebelo, T., Savolainen, V., 2011. Causes of Plant Diversification in the Cape Biodiversity Hotspot of South Africa. *Syst. Biol.* 60, 343–357.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615–629.
- Semagn, K., Bjørnstad, A.A., Ndjondjop, M.N., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5.
- Severns, P.M., Liston, A., Wilson, M.V., 2011. Habitat fragmentation, genetic diversity, and inbreeding depression in a threatened grassland legume: is genetic rescue necessary? *Conserv. Genet.* 12, 881–893.
- Smissen, R.D., Clement, J.C., Garnock-Jones, P.J., Chambers, G.K., 2002. Subfamilial relationships within Caryophyllaceae as inferred from 5' *ndhF* sequences. *Am. J. Bot.* 89, 1336–1341.
- Smouse, P.E., Whitehead, M.R., Peakall, R., 2015. An informational diversity framework, illustrated with sexually deceptive orchids in early stages of speciation. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1375–1384.

- Smulders, M.J.M., Noordijk, Y., Rus-Kortekaas, W., Bredemeijer, G.M.M., Vosman, B., 2003. Microsatellite genotyping of carnation varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106, 1191–1195.
- Smulders, M.J.M., Rus-Kortekaas, W., Vosman, B., 2000. Microsatellite markers useful throughout the genus *Dianthus*. *Genome* 43, 208–210.
- Soltis, D.E., Segovia-Salcedo, M.C., Jordon-Thaden, I., Majure, L., Miles, N.M., Mavrodiev, E.V., Mei, W., Cortez, M.B., Soltis, P.S., Gitzendanner, M.A., 2014. Are polyploids really evolutionary dead-ends (again)? A critical reappraisal of Mayrose et al. (2011). *New Phytol.* 202, 1105–1117.
- Somogyi, G., 2013. Taxonomical evaluation of Central-European *Dianthus* species of sect. *Plumaria* (Opiz) Asch. et Graebn based on molecular evidences. *Dok. väitekirj. Corvinus University of Budapest, Budapest.*
- Spielman, D., Brook, B.W., Frankham, R., 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15261–15264.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14, 323–327.
- Thompson, J.D., 2005. *Plant Evolution in the Mediterranean*. OUP Oxford.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Res.* 10, 967–981.
- Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O., Edmondson, J.R., Heywood, V.H., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), 1993. *Flora Europaea: Psilotaceae to Platanaceae*. Cambridge University Press.
- Valente, L.M., Savolainen, V., Vargas, P., 2010. Unparalleled rates of species diversification in Europe. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 1489–1496.
- Vandijk, P., Hartog, M., Vandelden, W., 1992. Single Cytotype Areas in Autopolyploid *Plantago-Media* L. *Biol. J. Linn. Soc.* 46, 315–331.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23, 48–55.
- Varshney, R.K., Hiremath, P.J., Lekha, P., Kashiwagi, J., Balaji, J., Deokar, A.A., Vadez, V., Xiao, Y., Srinivasan, R., Gaur, P.M., Siddique, K.H., Town, C.D., Hoisington, D.A., 2009. A comprehensive resource of drought- and salinity- responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Genomics* 10, 523.
- Weiss, H., Dobeš, C., Schneeweiss, G.M., Greimler, J., 2002. Occurrence of tetraploid and hexaploid cytotypes between and within populations in *Dianthus* sect. *Plumaria* (Caryophyllaceae). *New Phytol.* 156, 85–94.

- Wheeler, G.L., Dorman, H.E., Buchanan, A., Challagundla, L., Wallace, L.E., 2014. A Review of the Prevalence, Utility, and Caveats of Using Chloroplast Simple Sequence Repeats for Studies of Plant Biology. *Appl. Plant Sci.* 2, 1400059.
- Zalapa, J.E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R., Simon, P., 2012. Using Next-Generation Sequencing Approaches to Isolate Simple Sequence Repeat (ssr) Loci in the Plant Sciences. *Am. J. Bot.* 99, 193–208.
- Zander, R.H., 2004. Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and Bayesian posterior probability. *Phyloinformatics* 2, 1–13.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11, 1–16.
- Zhang, L., Cai, Y.-M., Zhuge, Q., Zou, H.-Y., Huang, M.-R., 2002. [Sequence of the ITS region of nuclear ribosomal DNA(nrDNA) in Xinjiang wild *Dianthus* and its phylogenetic relationship]. *Yi Chuan Xue Bao* 29, 549–554.

Kasutatud internetileheküljed:

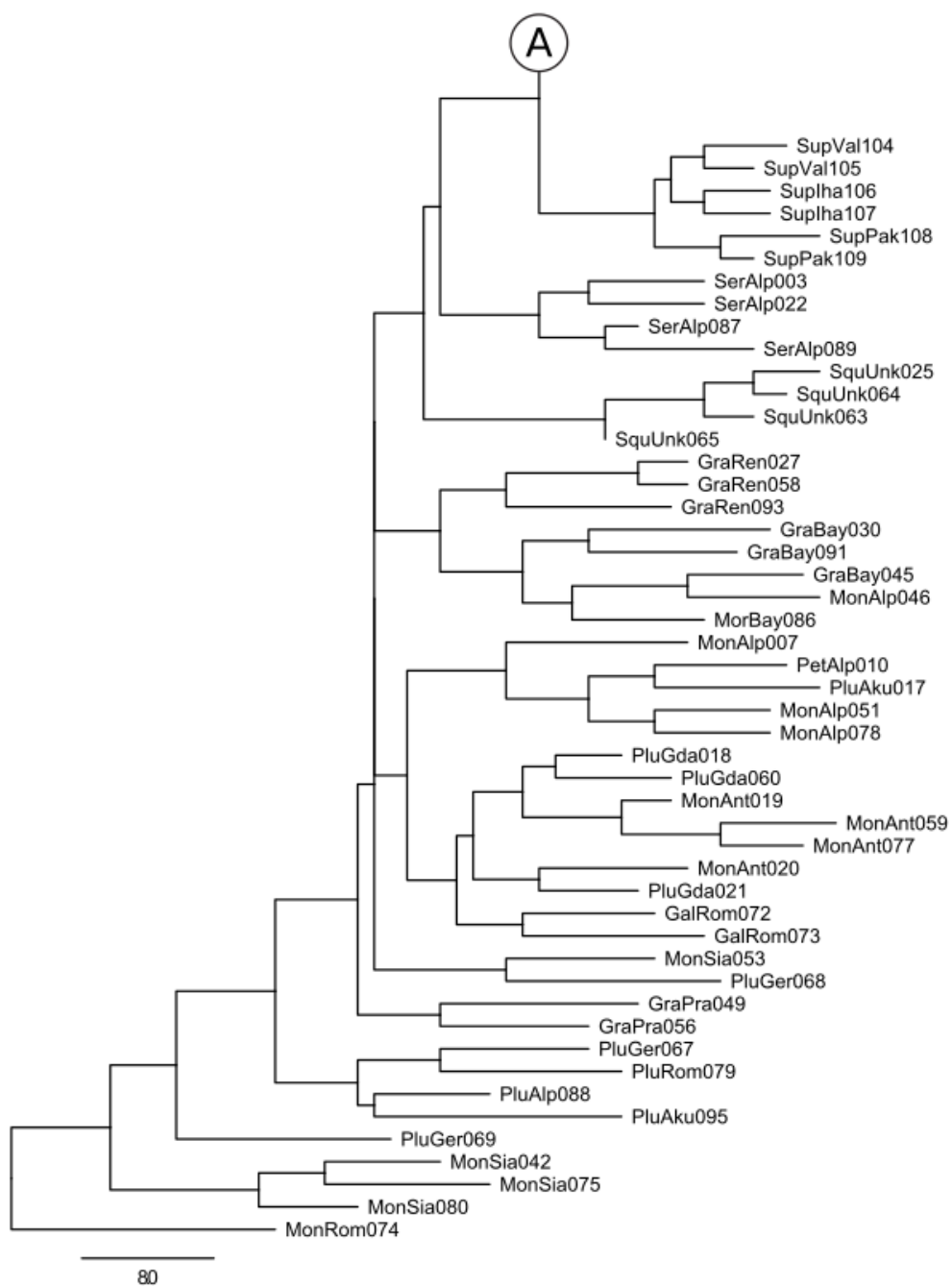
eElurikkus [<http://elurikkus.ut.ee/index.php?lang=est>] (2016-05-20)

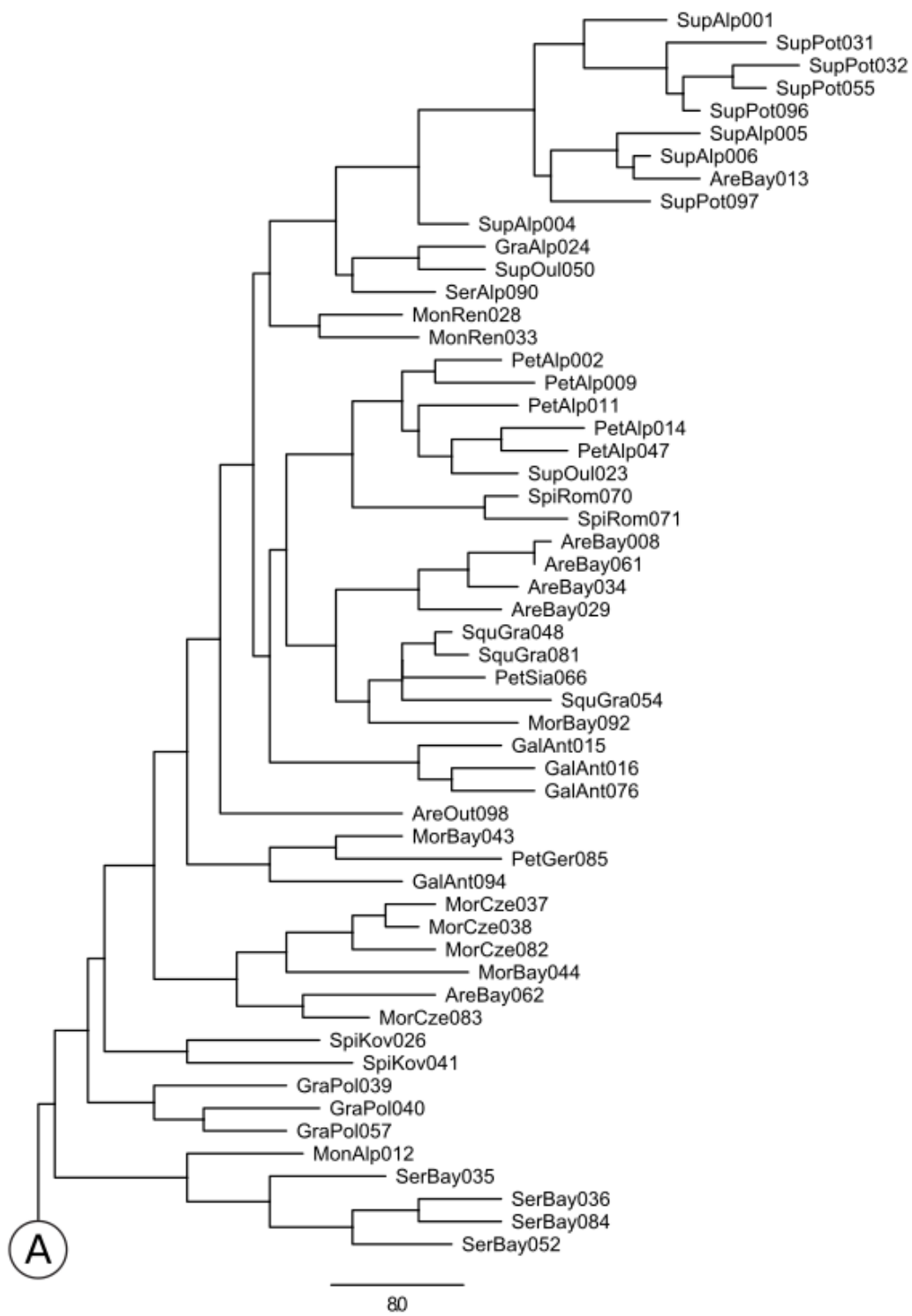
Applied Biosystems. Peak Scanner Software v 1.0 [<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html>] (2016-05-20)

10. Lisad

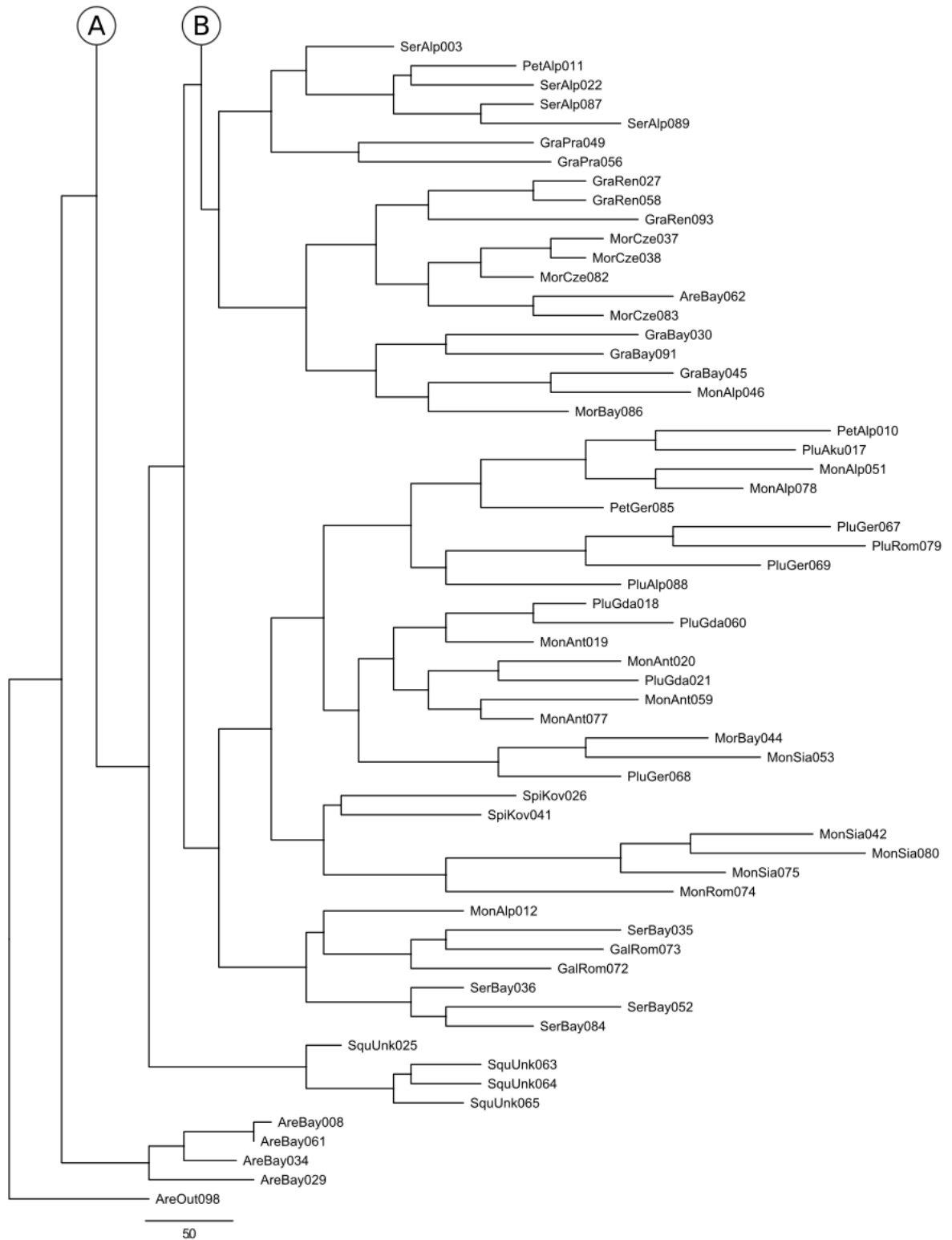
10.1 Lisa 1: UPGMA isendipuu

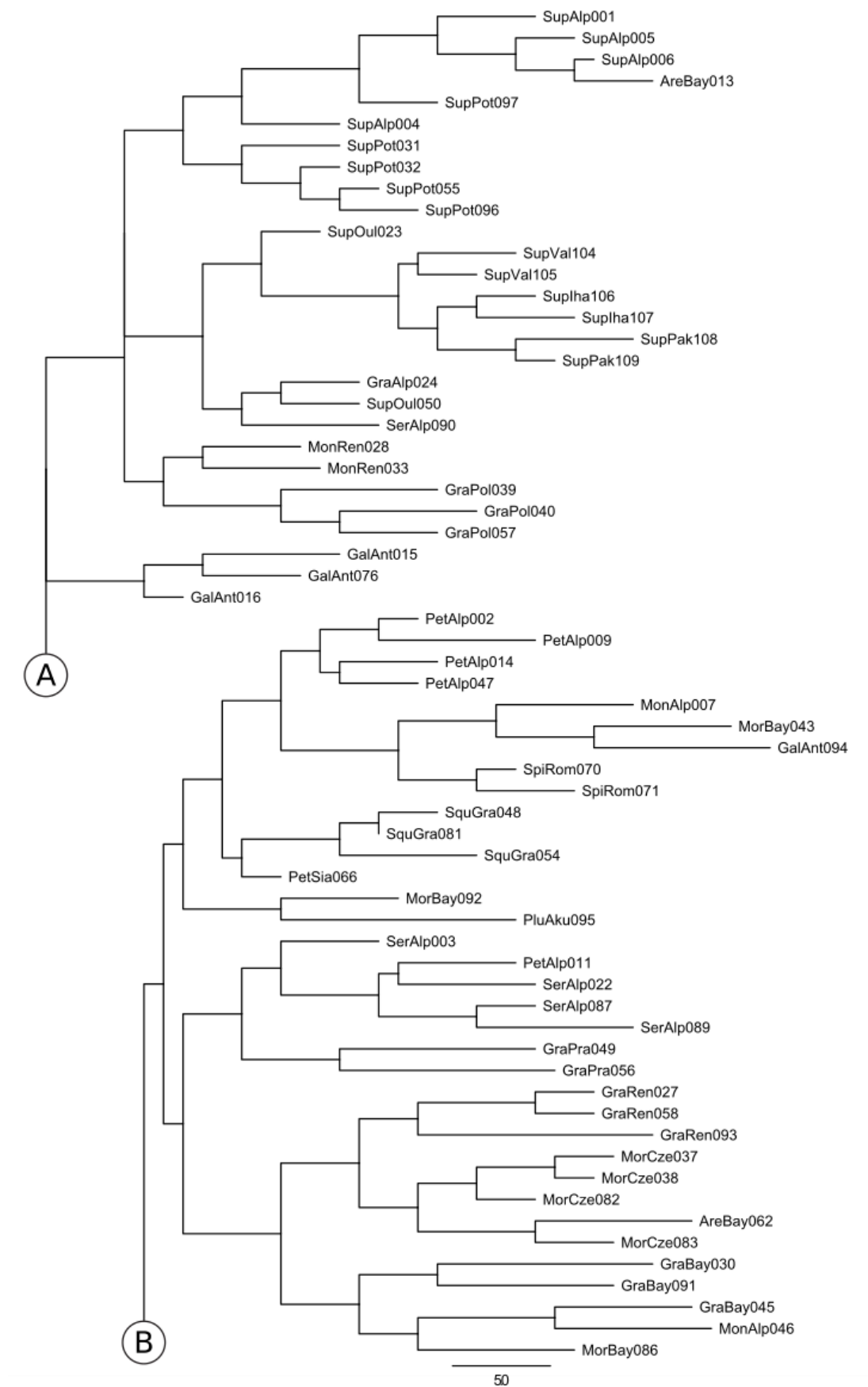
Isendite lühendite tähistused on välja toodud tabelisl 2. Viimased 3 numbrit tähistavad isendi ID-d.





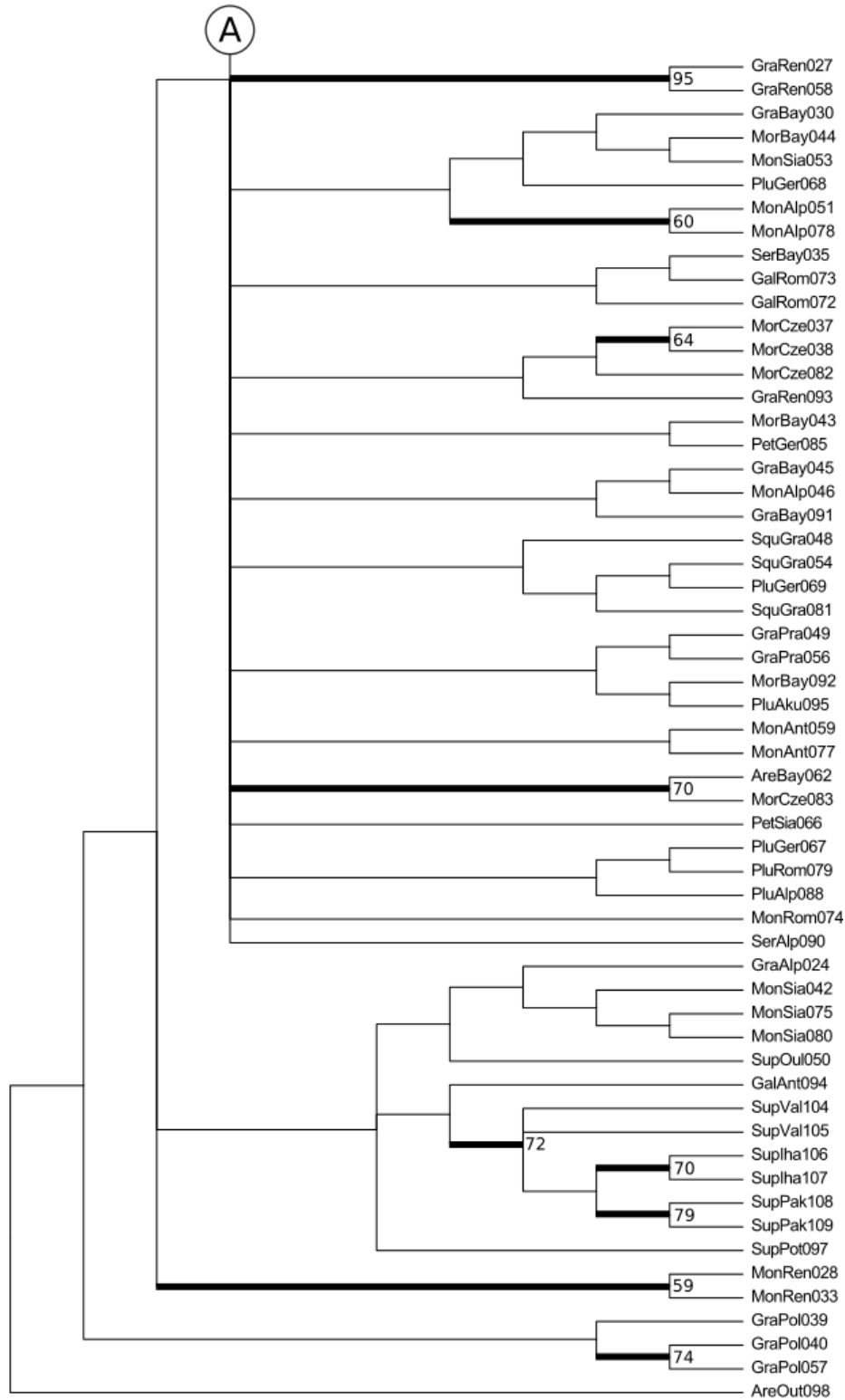
10.2 Lisa 2: NJ isendipuu

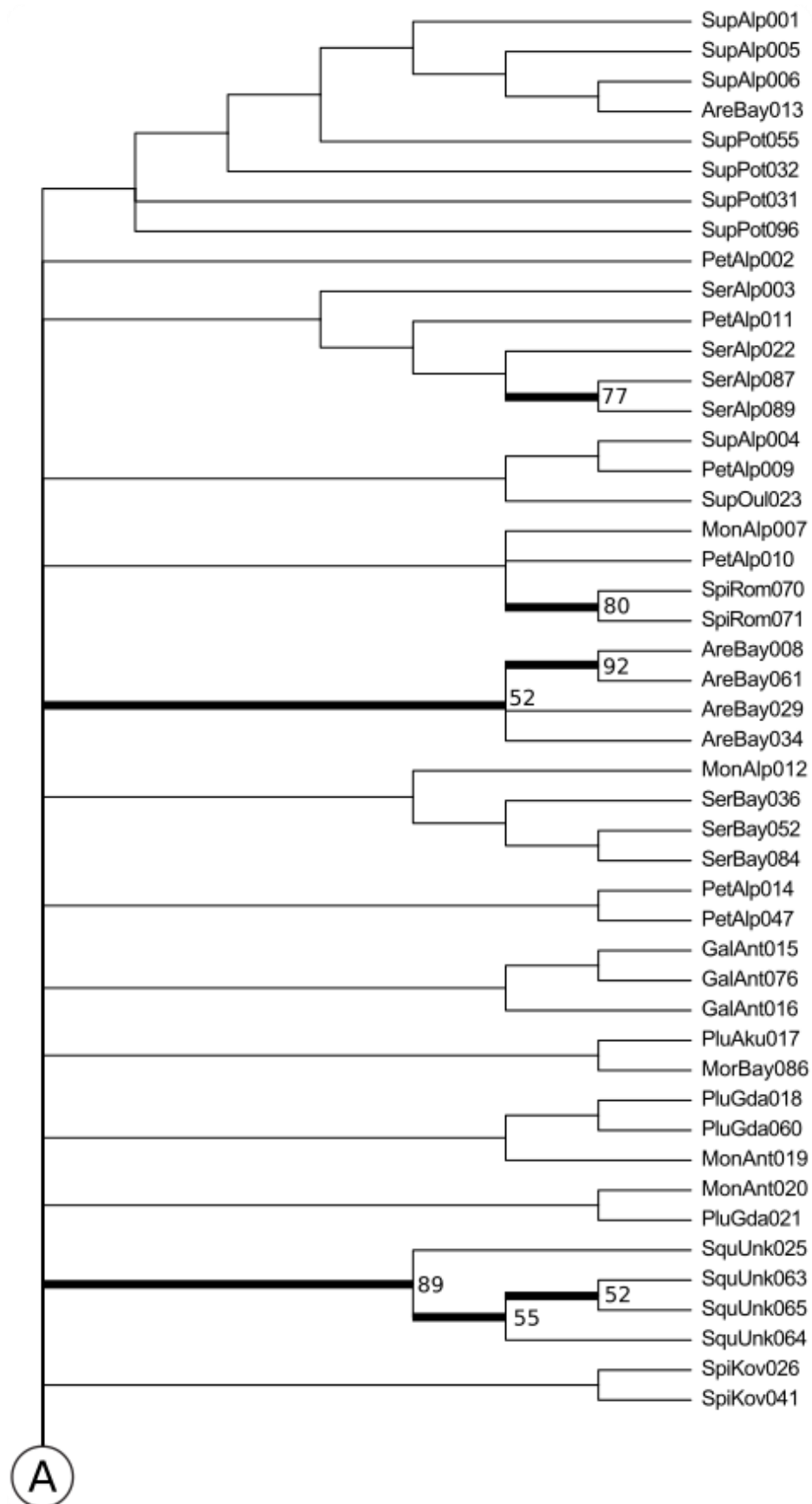




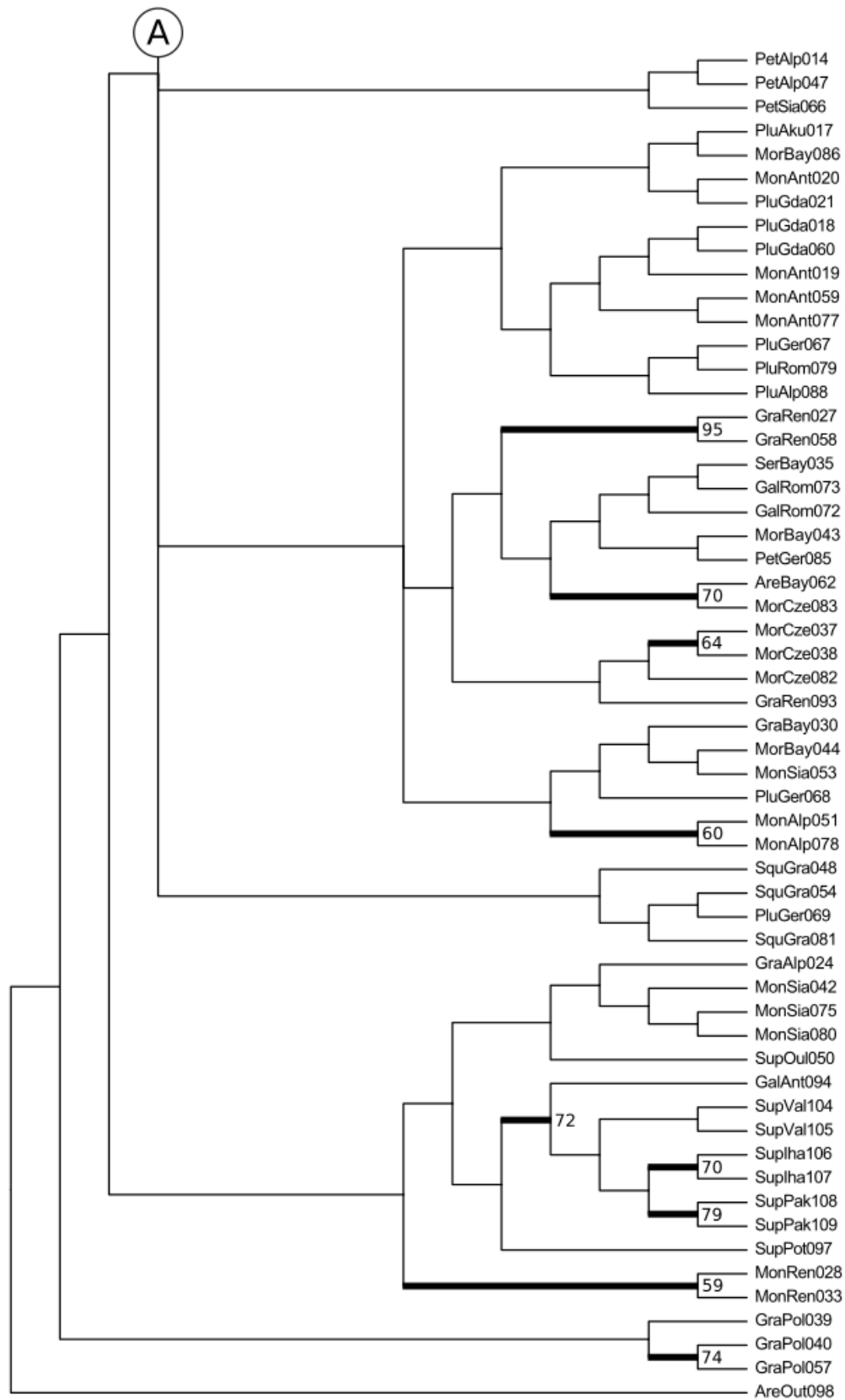
10.3 Lisa 3: Heuristilise otsingu 100% konsensuspuu

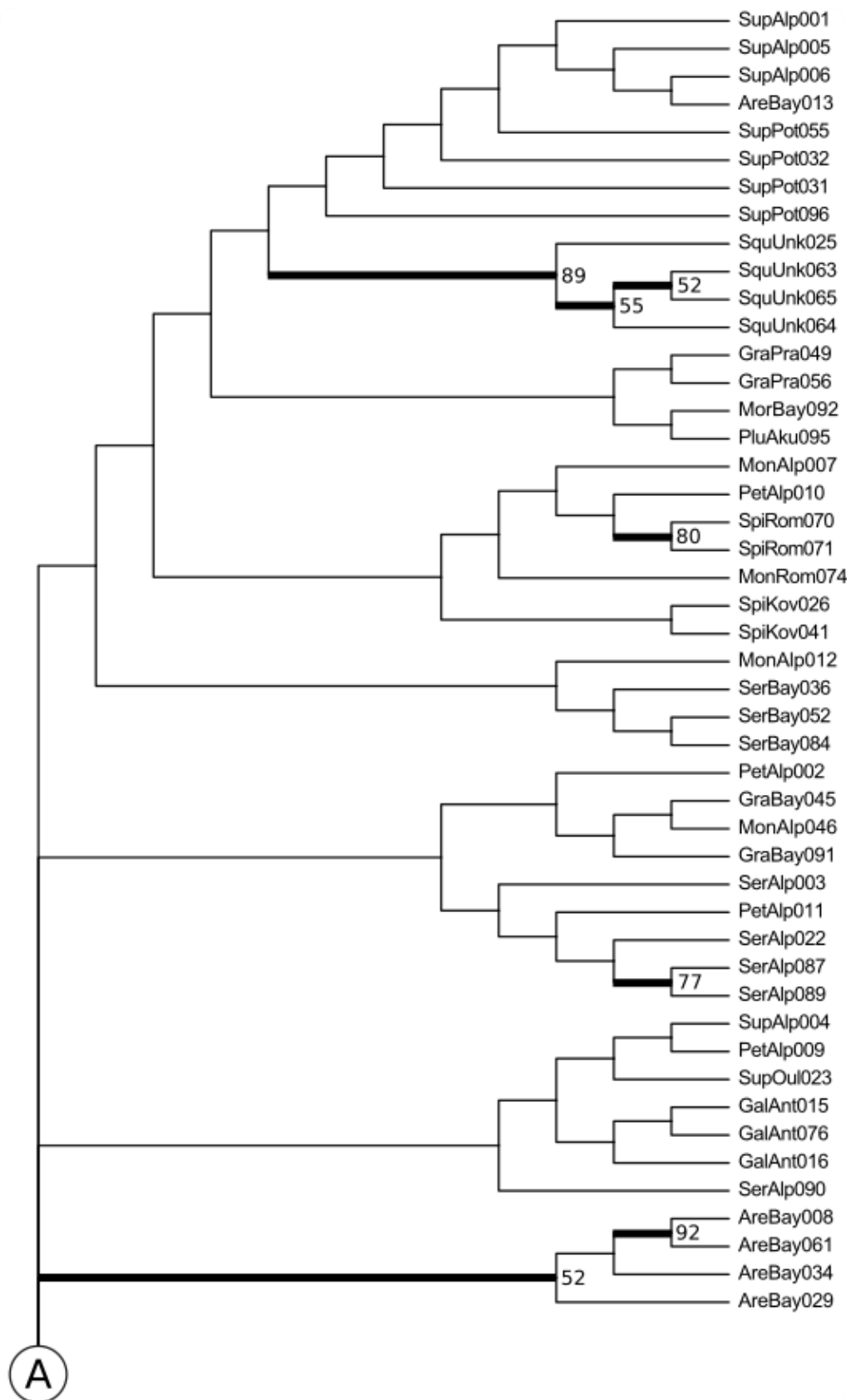
Siin ja edaspidi tähistavad paksud jooned *bootstrap* analüüsil toetust leidnud harusid. Välisrühmaks on valitud proov *AreOut098* (*Dianthus arenarius*).





10.4 Lisa 4: Heuristilise otsingu 50% konsensuspuu





Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rahel Valdmaa,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Perekonna *Dianthus* L. sektsiooni *Plumaria* liikide geneetiline varieeruvus ja fülogeneetilised suhted mikrosatelliitmarkerite alusel,

mille juhendaja on Silvia Pihu,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **20.05.2016**